UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-62 N° 17

# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'Etat)

par

Guy DIRHEIMER

Pharmacien
Certifié de Chimie Biologie et de Physiologie Générale
Diplômé de Sérologie
Attaché de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

---

1re THÈSE

## ISOLEMENT ET ANALYSE D'UN SUBSTRAT SOLUBLE DU LYSOZYME A PARTIR DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS ET CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DU LYSOZYME SUR CE SUBSTRAT

2me THÈSE

## PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

---

*Soutenues le 6 Octobre 1961 devant la Commission d'examen :*

Examinateurs de la Thèse — MM. J.P. EBEL, Professeur, Président
P. DUQUENOIS, Professeur
P. MÉTAIS, Maitre de Conférences — Juges

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0034

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE
Année scolaire 1961-62 N° 17

# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'Etat)

par

Guy DIRHEIMER

Pharmacien
Certifié de Chimie Biologie et de Physiologie Générale
Diplômé de Sérologie
Attaché de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

---

1re THÈSE

## ISOLEMENT ET ANALYSE D'UN SUBSTRAT SOLUBLE DU LYSOZYME A PARTIR DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS ET CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DU LYSOZYME SUR CE SUBSTRAT

2me THÈSE

## PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

---

*Soutenues le 6 Octobre 1961 devant la Commission d'examen :*

Examinateurs de la Thèse : MM. J.P. EBEL, Professeur, Président
P. DUQUENOIS, Professeur
P. MÉTAIS, Maître de Conférences — Juges

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Université de Strasbourg

# FACULTE DE PHARMACIE

---

Administration :

MM. DUQUENOIS, Doyen

GAZET DU CHATELIER, Assesseur

CLADY, Secrétaire

Professeurs :

| | |
|---|---|
| MM. Lapp | Physique |
| Sartory | Bactériologie |
| Cordier | Pharmacie chimique |
| Duquénois | Matière médicale |
| Jaeger | Botanique |
| Gazet du Chatelier | Pharmacie galénique |
| Hasselmann | Chimie analytique |
| Schreiber | Chimie organique |
| Ebel | Chimie biologique |

Maîtres de Conférences :

| | |
|---|---|
| MM. Ledoux | Sciences naturelles |
| Métais | Sciences appliquées |
| Malgras | Sciences naturelles |
| Laustriat | Sciences physico-chimiques |

Maître de Conférences Honoraire :

M. Collard

Cours Complémentaires :

| | |
|---|---|
| MM. Lapp | Acoustique |
| Sartory | Cryptogamie |
| Cordier | Eléments de Chimie organique |
| Duquénois | Hydrologie |
| Gazet du Chatelier | Pharmacodynamie |
| Hasselmann | Chimie minérale |
| Schreiber | Chimie générale |
| Ebel | Biochimie analytique et séméiologique |

Cours Complémentaires (suite) :

| | |
|---|---|
| MM. Lavigne ..... | Législation et Déontologie pharmaceutiques |
| Ledoux ..... | Bactériologie pharm. et technique |
| Malgras ..... | Sérologie |
| Laustriat ..... | Minéralogie et Eléments de mathématiques |
| Meyer ..... | Comptabilité et Fiscalité pharmaceutiques |

Chefs de Travaux pratiques :

| | |
|---|---|
| Mme Kristensen ..... | Chimie pharmaceutique |
| MM. Mathis (ch. des fonctions) ..... | Chimie |
| Carbiener (ch. des fonctions) .. | Histoire naturelle |
| Stahl (ch. des fonctions) ..... | Bactériologie et Parasitologie |
| Lapp Ch.F. (ch. des fonctions).. | Chimie et Physique |
| Romond (ch. des fonctions) ..... | Bactériologie |

---

A ma femme,

A mon fils,

A mes parents

En témoignage de ma reconnaissance
et de mon affection,

A la mémoire de ma soeur,

A tous ceux qui me sont chers.

# INTRODUCTION

Après la découverte par Fleming du lysozyme (1922) de nombreux travaux ont été consacrés à cette enzyme qui fut obtenue cristallisée dès 1931 par Roberts et dont la structure exacte est près d'être établie (Thomson 1955, Jollès et collaborateurs 1960).

Fleming découvrit cette enzyme grâce à la propriété qu'elle manifeste de dissoudre une bactérie à gram positif appartenant au genre *Sarcina* et qu'il nomma provisoirement pour la circonstance ***Micrococcus lysodeikticus***.

Pratiquement l'activité enzymatique du lysozyme n'a pu être étudiée que sur des suspensions de bactéries entières. Mais le mécanisme de la lyse est demeuré longtemps obscur comme le montre l'historique qui constitue le premier chapitre de la partie bibliographique de cette thèse. La démonstration que l'action du lysozyme consiste à dissoudre la paroi bactérienne n'a été apportée qu'en 1952 par Salton sur des préparations de parois isolées et purifiées, préparations que nous décrivons dans le chapitre II.

Des efforts d'isolement d'un substrat soluble chimiquement défini à partir de ***Micrococcus lysodeikticus*** se sont succédés depuis 1929 (Hallauer) et récemment encore Schutte et Krisch (1958), améliorant les techniques antérieures, ont décrit une méthode de préparation d'un mucopolysaccharide hydrolysable par le lysozyme. L'ensemble de ces travaux est résumé dans le chapitre III. Le chapitre IV présente les connaissances acquises relatives à l'action du lysozyme sur divers substrats purifiés.

Le substrat obtenu par Schutte et Krisch paraissait suffisamment purifié pour permettre d'entreprendre l'étude de la cinétique d'hydrolyse par le lysozyme et de tenter de vérifier les particularités prévues par l'étude morphologique et enzymatique de la lyse des bactéries entières. C'est le travail qui nous fut confié par le Médecin Commandant Colobert et qui fait l'objet de la partie expérimentale de cette thèse. Après avoir présenté dans le chapitre V les techniques analytiquee utilisées nous avons étudié dans le chapitre VI l'effet du lysozyme sur le substrat préparé selon Schutte et Krisch, d'une part par viscosimétrie, d'autre part par dosage des produits réducteurs libérés. Nous n'avons

pas pu confirmer que la diminution de viscosité du substrat précède l'hydrolyse chimique, constatation qui avait fait admettre à divers auteurs que le lysozyme manifestait une activité dépolymérasique indépendante de l'activité hydrolasique.

Ayant constaté que le substrat préparé selon Schutte et Krisch ne représentait pas une substance pure, nous en avons entrepris la purification. Les résultats de cette tentative sont exposés dans le chapitre VII. Le chapitre VIII est consacré à l'étude analytique du substrat purifié obtenu. Dans le chapitre IX nous étudions l'hydrolyse du substrat purifié et nous précisons l'influence des ions dont l'importance avait été signalée depuis longtemps (Fleming et Allison, 1922).

Avant d'entrer dans le détail de nos recherches nous tenons à remercier ceux qui ont aidé à leur réalisation.

Notre reconnaissance toute particulière va d'abord au Médecin Commandant Colobert, Maître de Recherches des Services de Santé des Armées, Chef du Laboratoire de Bactériologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées. Il a été l'instigateur de ce travail dont il a suivi et guidé, pas à pas, la progression et l'élaboration.

Nos remerciements respectueux vont à notre maître Monsieur J.P. Ebel, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg qui a bien voulu s'intéresser à ce travail au cours de son élaboration et qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à Monsieur le Doyen P. Duquénois, Professeur de Matière Médicale à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui a bien voulu faire partie de notre jury de thèse.

Notre reconnaissance va également à Monsieur P. Métais, Maître de Conférences de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, que nous sommes heureux de compter parmi nos juges.

Nous ne saurons oublier de remercier tous nos amis du Laboratoire de Bactériologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, en particulier Monsieur J Feitz, qui tous, dans une atmosphère agréable, ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

Nous remercions Monsieur P. Jollès, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a bien voulu réaliser le dosage quantitatif des acides aminés dans le substrat purifié et Madame Aubel-Sadron, Chargée de Recherches au C.N.R.S., qui a bien voulu effectuer les dosages d'azote.

# PREMIERE PARTIE

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## CHAPITRE I

### LA LYSE BACTERIENNE DIRECTE DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*

C'est en 1922 que Fleming mit en évidence le lysozyme dans les sécrétions nasales d'abord, puis dans les larmes, la salive, le lait de femme, le sperme, les ongles, les cheveux. Sa présence fut ensuite constatée dans d'autres parties de l'organisme humain, ainsi que chez les animaux et les végétaux. Cette protéine ajoutée à une suspension de certaines bactéries et notamment de *Micrococcus lysodeikticus* en provoque rapidement la clarification. Ce phénomène est dû à un mécanisme enzymatique comme le constata Fleming. La démonstration expérimentale en fut aisée. Introduit dans une suspension de bactéries sensibles, le lysozyme se fixe immédiatement sur ces microorganismes, si l'on centrifuge avant que la lyse ait lieu, tout le lysozyme est entraîné dans le culot, il est par contre retrouvé dans le surnageant si la lyse est achevée. Il peut être utilisé pour dissoudre d'autres bactéries, récupéré et ainsi de suite (Fleming et Allison, 1922).

En revanche, le mécanisme de la lyse est demeuré longtemps incertain. Deux groupes de chercheurs avaient émis des hypothèses contradictoires quant à son mode d'action. Boasson en 1938 avait observé l'action du lysozyme sur les bactéries grâce au microscope à fond noir. D'après cet auteur, le lysozyme ne dissout pas la paroi ectoplasmique des bactéries. Il ne fait que s'y fixer et en modifie la structure, ce qui permet au contenu cytoplasmique de diffuser dans le milieu. D'après lui, la clarification du milieu devait être attribuée à des changements d'indice de réfraction du contenu cellulaire, le volume limité par la paroi restant à peu près le même.

En 1945, Babudieri et Boetti après des travaux au microscope électronique arrivèrent à la conclusion que le lysozyme digérait peu à peu le contenu cellulaire sans rompre la paroi. Les cellules digérées augmentaient de volume et se vidaient de leur contenu. Ils obtenaient finalement une membrane transparente sans structure interne. Nemas et Wheatcraft (1952) confirmèrent ces travaux et pensèrent que c'était le lysozyme qui solubilisait le cytoplasme et en rendait possible le passage à travers la paroi cytoplasmique. Kern, Kingkade, Kern et Behrens (1951) montrèrent par la suite que la paroi était bien altérée par le lysozyme et que cette altération entraînait l'exosmose du cytoplasme. Ils n'obtinrent cependant pas la destruction complète de cette paroi qui, à la fin de la lyse, se retrouvait vidée de son contenu, mais non dissoute.

Un autre groupe d'observateurs, par contre, affirmait que le lysozyme ne modifiait nullement, au moins par son action propre, le contenu cellulaire, mais qu'il s'attaquait à la paroi qu'il arrivait à dissoudre complètement. Ce fut notamment l'opinion de Grula et Hartsell (1954 a, b, 1955, 1957 a, b). Les expériences de Salton (1952) sur des parois isolées de ***Micrococcus lysodeikticus*** par la méthode qu'il mit au point en 1951 (désintégration mécanique, puis centrifugation différentielle) démontrèrent de façon sûre la solubilisation de celles-ci par la lysozyme. En effet, des suspensions de parois étaient complètement clarifiées par l'enzyme et il ne persistait aucune structure résiduelle. De nombreux travaux ultérieurs de ce même auteur ont montré que la paroi était bien transformée par le lysozyme. Par dialyse, chromatographie sur papier et électrophorèse (Salton 1956, Salton 1957, Salton et Ghuysen 1959, Ghuysen et Salton 1960), neuf produits d'hydrolyse ont été préparés puis analysés pour l'instant. Tout récemment, Perkins (1960 a) a également étudié la composition d'un disaccharide libéré à partir de la paroi de ***Micrococcus lysodeikticus*** par le lysozyme.

La synthèse des deux thèses, en apparence contradictoires, a été faite par Colobert et Lenoir (1957) dans une étude portant sur une bactérie très voisine de ***Micrococcus lysodeikticus*** appelée ***Coccus P*** * Ces auteurs ont effectué des prélèvements dans des suspensions bactériennes auxquelles ils avaient ajouté du lysozyme en concentration convenable et les ont étudiés au mi-

* Ces deux cocci sont en effet deux variétés de la même espèce : *Sarcina flava* (Colobert et Roquet 1957).

croscope électronique. Ils ont ainsi observé 4 phases : une première phase de gonflement des bactéries avec aplatissement, comme si la paroi perdait de sa rigidité et que le cytoplasme s aplatissait sur le support une deuxième phase au cours de laquelle la paroi disparaissait, laissant le cytoplasme nu, les cellules prenant ainsi l'aspect décrit par Staehelin (1954), sous le nom de gymnoplastes. Enfin, dans une troisième phase, le cytoplasme se dispersait laissant des granules disparaissant eux-mêmes dans la quatrième phase. Ces deux dernières phases évoluaient bien plus lentement que les premières.

Etudiant parallèlement la diminution de la densité optique de la suspension bactérienne Colobert et Lenoir (1957) ont constaté qu elle était linéaire pendant toute la durée des phases I et II, puis qu elle se ralentissait progressivement. D'après ces auteurs la clarification d une suspension bactérienne par le lysozyme serait donc dûe à la résultante de deux phénomènes : d une part la destruction de la paroi ectoplasmique par le lysozyme, phénomène enzymatique se manifestant dans les phases I et II observées au microscope électronique et se traduisant par l éclaircissement linéaire en fonction du temps de la suspension de bactéries d'autre part la dispersion du cytoplasme et sa solubilisation régies uniquement par les conditions physico-chimiques du milieu.

Or quand on élève suffisamment la concentration du lysozyme, les phénomènes se présentent tout à fait différemment. Tout d'abord, on n'observe plus au moyen du photomètre la clarification de la suspension bactérienne, ou bien celle-ci se trouve bien ralentie. Colobert et Lenoir (1957) ont appelé *inhibition paradoxale par excès d enzyme* ce phénomène qui avait été observé antérieurement notamment par Friedberger et Hoder (1932), Thomson (1940) et Wilcox et Daniel (1954). Tout se passe comme si l'activité du lysozyme était totalement inhibée. Il n'en est cependant rien car l'examen au microscope électronique prouve que les bactéries sont profondément altérées, le cytoplasme est devenu transparent et présente un aspect caractéristique granuleux en mûre, le corps bactérien semble s'être étalé sur la préparation. L'aspect est identique à celui de la phase I précédemment décrite par Colobert et Lenoir (1957), mais qui était difficile à saisir à cause de sa précocité et de son peu de durée. Comme la membrane est visible sous forme d'une masse d'aspect muqueux gonflée et étalée, ces auteurs ont donné aux bactéries sous cette forme le nom d'*angioplastes* par opposition à la dénomina-

tion de gymnoplastes qu'ils avaient retenue pour caractériser la phase II dans laquelle la membrane a disparu.

En présence de grandes quantités de lysozyme, les membranes ne se dissolvent donc pas complètement mais semblent altérées. D'ailleurs, le cytoplasme bactérien diffuse lentement au travers de cette enveloppe visqueuse. Le contenu de l'angioplaste devient de plus en plus transparent et finalement seule reste l'enveloppe vide appelée fantôme. Cet état correspond exactement à celui décrit par les auteurs qui ont affirmé que le lysozyme ne détruit pas la paroi ectoplasmique mais provoque l'exosmose du protoplasme. Ceux-ci s'étaient donc placés, sans s'en douter, dans les conditions de l'inhibition paradoxale par excès d'enzyme.

---

# CHAPITRE II

## ISOLEMENT ET ANALYSE DES PAROIS DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*

Salton (1952) a prouvé que le substrat du lysozyme se trouvait entièrement compris dans la paroi ectoplasmique des bactéries sensibles à l'enzyme. Il avait auparavant mis au point des techniques permettant d'isoler des parois microbiennes dépourvues d'impuretés cytoplasmiques (Salton, 1951).

De nombreuses autres méthodes de préparation de ces membranes ont été décrites (Creach, 1960) : traitement des bactéries par les alcalis, rupture des bactéries par chauffage, rupture par congélation, broyage mécanique avec ou sans abrasif, destruction par les ultra-sons ou par action enzymatique. Salton et Horne (1951) obtinrent des parois de *Micrococcus lysodeikticus* grâce à l'appareil de Mickle (1948). Le principe de cet appareil, inspiré des travaux de Von Ardenne (1941), est le suivant : deux barres d'acier faisant ressort vibrent à la fréquence du courant alternatif du secteur, elles portent à une extrémité un récipient cylindrique en verre dans lequel se trouve la suspension bactérienne en contact avec des perles de verre très petites (ballotini). Les bactéries sont très rapidement détruites avec ce désintégrateur.

Quel que soit le procédé de désintégration utilisé, on sépare les parois du cytoplasme par centrifugation. Elles sont cependant encore contaminées par des protéines solubles ou dénaturées, des acides nucléiques et des particules cellulaires qui y adhèrent, et doivent en être débarassées. L'étape suivante dans le procédé d'isolement est donc le lavage des parois par de l'eau distillée, des solutions de chlorure de sodium ou des tampons. On peut aussi les traiter par des enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine) et par la ribonucléase (McCarty 1952, Cummins 1956 a, Cummins et Harris 1956). Mais l'usage d'enzymes protéolytiques n'enlève pas seulement des impuretés cytoplasmiques, il peut également provoquer l'hydrolyse des peptides se trouvant à la surface même de la paroi (Cummins 1956). Salton et Horne (1951) enlèvent les derniers restes de cyto-

plasme en lavant les parois avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7.

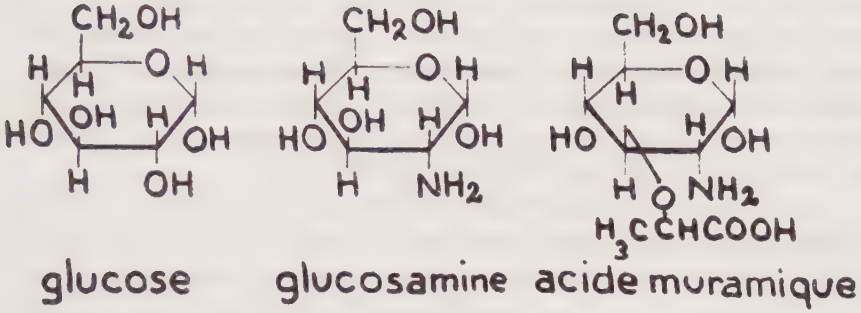
Quelle que soit d'ailleurs la méthode de préparation utilisée pour préparer les parois, le seul critère de pureté du matériel obtenu finalement est son examen au microscope électroniqueet les préparations ombrées sont indispensables pour pouvoir contrôler le degré d'élimination du protoplasme.

Salton (1953) rechercha par chromatographie sur papier les composants des parois de ***Micrococcus lysodeikticus*** après les avoir hydrolysées. Il y trouva comme seul glucide le glucose. Quatre acides aminés y furent également décelés en quantité décroissante : l'alanine, l'acide glutamique, le glycocolle et la lysine. La composition en hexosamines fut plus difficile à élucider. Salton (1953) signala leur présence mais sans spécifier leur nature. Mais Cummins et Harris (1956) mirent en évidence, par chromatographie bidimensionelle, la présence de glucosamine et d'une substance lui ressemblant et qui se révéla être identique à celle trouvée dans les hydrolysats acides de peptides exsudant des spores de divers ***Bacillus*** (Strange et Powell 1954). En 1956, Salton trouva que la N-acétylglucosamine et cette hexosamine inconnue acétylée représentaient les constituants du diholoside obtenu par action du lysozyme sur les parois isolées de ***Micrococcus lysodeikticus***. Ce travail fut confirmé par Salton et Ghuysen (1959), Perkins (1960 a) et Ghuysen et Salton (1960). Entre temps cette hexosamine inconnue, appelée acide muramique par Strange, fut isolée par chromatographie sur colonne (Strange 1956). Elle fut analysée par cet auteur qui lui attribua la formule d'une 3-O-α carboxyéthyl D glucosamine ou 3-O-lactyl D glucosamine, résultat confirmé par Kent (1957) qui en fit la synthèse (Figure A).

En 1957, Weidel et Primosigh ont trouvé une substance apparemment semblable dans les parois isolées de ***Escherichia Coli***. Park et Strominger (1957) ont montré que l'hexosamine inconnue, trouvée par Park (1952) dans un uridine-pyrophosphate-peptide, qui s'accumule quand on traite les cellules de ***Staphylococcus aureus*** par la pénicilline, était probablement cette substance. Kent (1957) et Strange et Kent (1959) firent la synthèse chimique de l'acide muramique et montrèrent qu'il avait des propriétés très peu différentes de celles de l'acide muramique naturel. Cependant, comme le pense Zilliken (1959), il se pourrait que l'acide muramique se trouve combiné ***in vivo*** à d'autres groupements. Ainsi Agreen (1958) a isolé récemment un acide muramique phosphorylé à partir de ***Lactobacillus casei***.

Parallèlement à ces travaux qualificatifs, quelques résultats

figure A




d'analyses quantitatives de la paroi de *Micrococcus lysodeikticus* ont été publiés. Les résultats de Perkins et Rogers (1958, 1959) et de Salton (1960) figurent dans le tableau I.

TABLEAU I

Résultats des Analyses quantitatives des parois isolées de *Micrococcus lysodeikticus*

| | % | % | Rapport molaire | % | Rapport molaire | % | Rapport molaire |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glucose | 4,5 | 4,1 | 0,31 | 4 | 0,28 | 42,6<br>43,1<br>ou 7,5<br>ou 4,3* | |
| Glucosamine | 10,0 | 10,1 | 0,64 | 12,8 | 0,65 | 16-22 | |
| Acide muramique | 8,0 | 19,8 | 0,89 | 22,0 | 0,92 | | |
| Alanine | 20,0 | 20,2 | 2,50 | 16,3 | 1,90 | | 2,6 |
| Acide glutamique | 13,0 | 13,8 | 1,00 | 14,1 | 1,00 | | 1,0 |
| Glycine | 11,0 | 10,8 | 1,6 | 8,5 | 1,20 | | 1,0 |
| Lysine | 20,0 | 13,1 | 1,0 | 13,3 | 0,95 | | 1,0 |
| | Perkins et Rogers (1958) | Perkins et Rogers (1959) | | Perkins et Rogers (1959) | | Salton (1960) | |

* Les sucres réducteurs totaux ont été évalués par Salton (1953-1960) par la méthode de Hagendorn Jensen après une hydrolyse à 100°C pendant 2 heures par l'acide chlorhydrique 2N. Les valeurs obtenues : 44,9 (1953) 42,6-43,1 % (1960) sont nettement plus élevées que celles trouvées par la méthode à l'anthrone : 7,5 % ou par la glucose oxydase : 4,3 %. Les taux d'hexosamine trouvés par Salton 16-22 % ne suf-

Salton ne trouva pas de ribitol par le réactif de Schiff dans les hydrolysats des parois, ce qui fait penser à l'absence d'acide teichoïque chez *Micrococcus lysodeikticus*, ce que Baddiley et collaborateurs (1958) avaient déjà constaté à la suite de leurs propres recherches. Enfin les groupements O-ester, que Brumfit et collaborateurs (1958) rendaient responsables de la résistance au lysozyme de certaines souches microbiennes, ne représentaient, exprimés en O-acétyl, que 0,008 % du poids sec de la paroi (Salton 1960).

Enfin les parois contiennent en tout 8,7 % d'azote total et 0,09 % de phosphore total (Salton 1953).

---

fisent pas à expliquer un tel écart. Strange et Dark (1955) pensent que cette différence tient au fait que des acides aminés libérés par l'hydrolyse acide viennent interférer avec les sucres dans la méthode de Hagendorn Jensen.

# CHAPITRE III

## PREPARATIONS ET ANALYSES DES SUBSTRATS SOLUBLES OBTENUES A PARTIR DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*

Hallauer (1929) émit le premier la suggestion que le substrat sur lequel agissait le lysozyme était une mucoprotéine des Sarcines. Cette hypothèse fut confirmée par Meyer, Palmer, Thomson et Khorazo (1936). Leur procédé d'extraction était le suivant : les bactéries lavées étaient séchées par l'acétone puis hydrolysées et extraites par une base diluée, un acide dilué et enfin par de l'acide acétique à 90 %. Le résidu de cette extraction était digéré par de la soude 2,5N pendant 10 à 30 minutes à 100°C. Une fraction mucoprotéique en était ainsi extraite et se trouvait dans le surnageant après centrifugation. On la recueillait par précipitation alcoolique, redissolution dans l'eau et reprécipitation alcoolique à pH acide. Finalement on la lavait avec de l'acétone et on la séchait.

Cette mucoprotéine contenait 0,72 % de cendres (95 % des cendres étaient des phosphates) 6,33 % d'azote et 19,5 % de glucose après hydrolyse acide.

En 1940 Epstein et Chain publièrent un article dans lequel ils décrivirent deux autres méthodes de préparation. L'une utilisait l'action de l'hypochlorite de sodium sur les bactéries, suivie d'une précipitation du mucopolysaccharide par l'alcool. Le substrat brut ainsi obtenu était dissous dans la formamide, puis fractionné par l'alcool et l'acétone. L'autre technique décrite par ces auteurs était la dissolution des microorganismes par la formamide pendant 15 minutes à 170°C. A froid cette solution laissait sédimenter un produit qui était extrait par l'eau chaude. Après avoir éliminé les protéines en déféquant par l'alcool, on précipitait le substrat par l'acétone.

Ce substrat se présentait comme une poudre brun clair, faiblement soluble dans l'eau dans laquelle elle donnait des solutions visqueuses, soluble dans la formamide, l'éthylène glycol et l'alcool dilué, insoluble dans l'alcool absolu l'acétone, l'éther, le chloroforme, le métacrésol, la pyridine et le dioxan-

ne. Elle n'était pas dialysable à travers la cellophane ou les membranes de collodion. Elle ne contenait pas de protéines. Epstein et Chain n'analysèrent pas le substrat total mais seulement la partie que le lysozyme avait rendu dialysable et qui représentait 50 % du poids total. Elle contenait 6,4 % N, 45,4 % C et 6 % H. Ils ne trouvèrent à l'état libre que des traces de groupements aminés, mais une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2 N pendant 2 heures à 100°C en libérait 6,4 %. Par contre ces auteurs ne trouvèrent pas de groupements peptidiques décelables par la méthode du biuret. Le dosage des groupements acétylés leur en donna 11,4 % et celui des sucres aminés par la méthode d'Elson et Morgan leur en donna 30 %, valeur qu'ils supposèrent d'ailleurs inférieure à la réalité. Le pouvoir réducteur après hydrolyse correspondait exprimé en glucose à 41 % du poids de leur substrat. En recherchant la nature des sucres présents, ils obtinrent de nombreuses réactions colorées leur faisant supposer l'existence d'un cétohexose.

En 1946, Meyer et Hahnel firent progresser ces recherches en extrayant un mucopolysaccharide de haut poids moléculaire de *Micrococcus lysodeikticus* en traitant les bactéries par de la soude 0,5 N sous atmosphère d'azote. Comme nos travaux ont confirmé certains de leurs résultats, nous décrirons cette préparation avec plus de détails que les précédentes :

Les microorganismes étaient d'abord traités par l'acétone à froid, lavés par l'acétone et l'éther et enfin séchés. Cette poudre acétonique était mise en suspension dans la soude 0,5 N pendant 7 à 8 jours à 25°C sous atmosphère d'azote, puis la suspension était centrifugée après dilution. Le surnageant était jeté comme ne contenant guère de substrat du lysozyme et l'insoluble remis pendant 14 jours en présence de soude 0,5 N sous azote à 25°C. Les bactéries étaient ainsi dissoutes. La solution après dilution et centrifugation était acidifiée et précipitée par deux volumes d'alcool. Le précipité, redissous dans une solution d'acétate de sodium, était débarassé d'autres impuretés par agitation avec un mélange alcool amylique-chloroforme, puis on provoquait la précipitation d'hydroxyde de zinc dans la solution, ce qui entrainait sa clarification. Le substrat était finalement précipité à partir de cette solution par acidification et adjonction de 2 volumes d'alcool. On le lavait et on le séchait.

Ce substrat contenait entre 5,5 et 6,5 % d'azote et 23 et 30 % d'hexosamine dosée par la méthode de Palmer (1937). Meyer

et Hahnel ne donnèrent pas plus de détails en ce qui concerne l'analyse de leur produit.

C est la préparation de Meyer et Hahnel que reprirent Schutte et Krisch (1958) en la modifiant cependant. En effet, d après ces auteurs la soude déjà après huit jours d'action aurait extrait une grande partie du substrat du lysozyme de la poudre acétonique du microorganisme. Ils recueillèrent donc un premier extrait alcalin après une semaine mais continuèrent à traiter les bactéries insolubles comme le faisaient Meyer et Hahnel par de la soude 0 5 N à 25°C sous azote ce qui leur donnait un deuxième extrait. Les deux solutions alcalines étaient acidifiées par l acide acétique ce qui en précipitait les protéines. Enfin le mucopolysaccharide était précipité par deux volumes d alcool saturé en acétate de potassium. Après lavage à l'alcool éther redissolution dans l eau dialyse élimination d'une petite partie insoluble reprécipitation et lavage par l'alcool-éther ces auteurs obtinrent un substrat du lysozyme. Cette méthode diffère donc de celle de Meyer et Hahnel (1946) par le fait qu'elle arrive à précipiter un substrat du lysozyme du premier extrait alcalin et surtout par sa technique de déféca tion par l acide acétique qui est bien plus commode que celle qui utilise le chloroforme l alcool amylique et l'hydroxyde de zinc. C est la technique de Schutte et Krisch (1958) que nous avons utilisée en y apportant cependant quelques modifications.

Schutte et Krisch (1958) firent une étude assez complète de leur substrat. Il s agissait d'une poudre blanche peu hygroscopique donnant des solutions de viscosité spécifique de 2 0 à 2 5 (concentration 1 g/l température 20°C). Voici les résultats des analyses en % des deux fractions qu ils isolèrent

| | N | P | Hexosamine | Groupements N-acétylés |
|---|---|---|---|---|
| Fraction I | 3,34 | 0,65 | 13,3 | 4,9 |
| Fraction II | 4,31 | 0,59 | 19,4 | 5,5 |

Ils attribuèrent la présence de phosphore à celle de 6 à 7% d'acide désoxyribonucléique, présence que leur faisait soupçonner le spectre d'absorption dans l'ultraviolet de leur substrat. Ce spectre présentait un minimum d'absorption à 235 mμ et un maximum à 260 mμ. La réaction de Feulgen d'une solution de leurs substances était positive. Cependant Schutte et Krisch ne réussirent pas à séparer cette impureté de leur substrat ni

par traitement par la désoxyribonuclase, ni par des précipitations fractionnées.

Ils ne trouvèrent pas de protéines dans leur substrat. Après une hydrolyse sulfurique, grâce à la chromatographie sur papier, ils décelèrent dans les produits de dégradation du glucose et de la glucosamine en grandes quantités, du mannose et du fucose en quantités plus faibles. Ils ne décelèrent ni fructose ni acide glycuronique.

En 1959 Perkins et Rogers isolèrent trois fragments à partir des parois de *Micrococcus lysodeikticus* hydrolysés par un acide. Ces trois fragments se sont montrés résistants à l'action du lysozyme.

Enfin, tout récemment, Salton et Ghuysen (Salton et Ghuysen 1959, Ghuysen et Salton 1960, Ghuysen 1960) isolèrent un composé polyosidique dialysable, à partir des parois de *Micrococcus lysodeikticus* digérées partiellement par le lysozyme, grâce à des chromatographies et à des électrophorèses successives sur papier Whatman 3MM et sur papier de fibre de verre. Ce corps chromatographiquement pur était encore hydrolysable par le lysozyme.

L'analyse de ce composé a montré qu'il s'agissait d'un tétraholoside composé de N acétylglucosamine et d'acide N acétylmuramique. En le faisant réagir sur du $BH_4Na$ à 0°C, ils obtinrent un composé ne donnant plus la réaction des sucres N acétylaminés, mais conduisant après hydrolyse à trois composés qu'ils séparèrent par chromatographie sur papier. Il s'agissait de glucosamine, d'acide muramique et d'un composé qu'ils appelèrent muramicitol (voir formules 2). Jamais les auteurs n'obtinrent le composé correspondant au produit de réduction de la glucosamine. Le rapport des trois produits de dégradation du tétraholoside réduit fut établi en isolant ce tétraholoside à partir des parois de *Micrococcus lysodeikticus* cultivé sur un milieu contenant du $^{14}C$ fructose et en le traitant comme déjà dit. Il donna par hydrolyse 2 glucosamines, 1 acide muramique et 1 muramicitol.

Le tétraholoside a donné en outre par action du lysozyme deux diholosides contenant de l'acide N acétylmuramique et de la N acétylglucosamine dans le rapport 1.1 (Ghuysen 1960). Dans ces diholosides le groupement réducteur était celui de l'acide muramique.

Enfin en faisant agir sur le diholoside la $\beta$ glucosidase, Salton et Ghuysen (1959) obtinrent de la N acétylglucosamine et de l'acide N acétylmuramique libres.

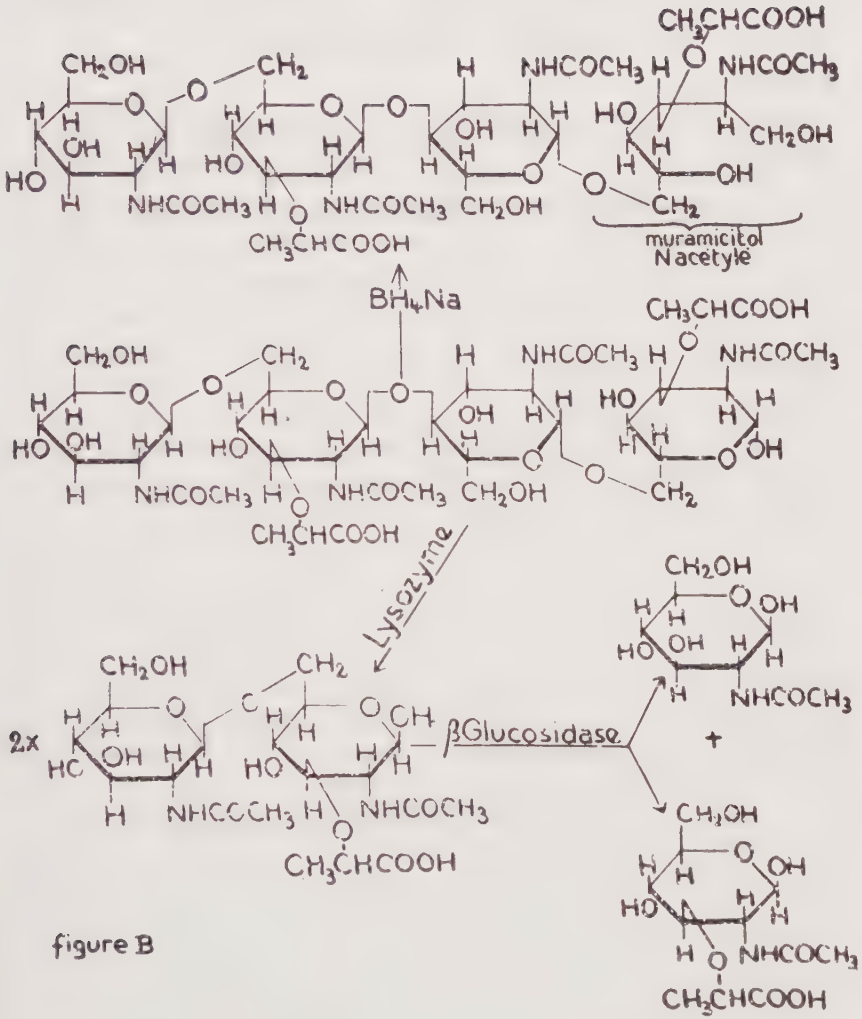



figure B

Tous ces résultats sont schématisés page 21 (Figure B) et ont conduit les auteurs à donner au tétraholoside la formule indiquée sur la figure B.

En traitant des parois isolées de *Micrococcus lysodeikticus* par un enzyme bactériolytique purifié tiré du Streptomyces et qu'ils appelèrent enzyme $F_1$, Ghuysen et Salton (1960) obtinrent un mucopolysaccharide également sensible à l'action du lysozyme. Ce deuxième substrat isolé par ces auteurs avait une composition plus complexe : c'était un diholoside peptide polyholoside

(Acide N acétylmuramique - N acétylglucosamine)
Peptide
(Acide N acétylmuramique - N acétylglucosamine)$_{10}$

---

# CHAPITRE IV

## ACTION DU LYSOZYME SUR LES PAROIS ET LES SUBSTRATS SOLUBLES DU LYSOZYME ISOLES A PARTIR DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*

### A) Action du lysozyme sur les parois isolées de *Micrococcus lysodeikticus*.

Boasson (1938) avait cru que les parois de *Micrococcus lysodeikticus* n'étaient pas détruites par le lysozyme, mais simplement rendues plus perméables, mais Kern et ses collaborateurs (1951) avaient montré au microscope électronique la dissolution de cette paroi. C'est Salton qui en fit l'étude détaillée. Il montra d'abord (1952) que le lysozyme clarifiait une suspension de parois isolées et que le pH optimum de cette lyse se situait entre 5 et 7. Etudiant ensuite la réaction plus en détail, il observa (1953 b, 1954) que la diminution de la turbidité de la suspension allait de pair avec l'apparition de sucres réducteurs. Il établit que le pH optimum de cette réaction était, en ce qui concerne la diminution de la turbidité, de 6,5 à 7,0 dans un tampon phosphate 0,1 M. La libération du substances réductrices avait un pH optimum à 7,0. Des discontinuités marquées étaient observées quand on passait du tampon acétate au tampon phosphate autour de pH 5,5. Cependant en utilisant des tampons de force ionique constante égales à 0,1, le pH optimum pour la libération de substances réductrices coïncidait avec celui de la réduction de turbidité : il était de 6,5.

Après action du lysozyme sur les parois isolées, Salton (1956) faisait une dialyse. 50 à 70 % du poids de départ des parois se retrouvaient dans le non dialysable dont le poids moléculaire moyen était de 10000 à 20000. A l'électrophorèse à pH 8,6, cette fraction fut séparée en trois constituants tous fortement électronégatifs (deux d'entre eux migraient encore vers l'anode à pH 4).

La substance dialysable fut isolée par chromatographie et électrophorèse. Elle donnait une réaction positive avec le phtalate d'aniline, le nitrate d'argent ammoniacal et les réactifs des sucres N acétylaminés. Il ne s'agissait cependant pas

de N acetylglucosamine libre. En effet, par hydrolyse ce petit fragment donnait de la glucosamine et un autre sucre aminé alors inconnu possedant un groupement carboxyle qui fut plus tard caractérise comme étant de l'acide muramique (Salton et Ghuysen 1959, Perkins 1960 a). Le petit fragment dialysable était un diholoside compose de N acétylglucosamine et d'acide N acétylmuramique lies par une liaison $\beta$ (1 → 6). Salton et Ghuysen (1960) isolèrent dans le dialysat trois autres substances. L'une etait un tétraholoside dimère du diholoside précédent dont nous avons déjà parlé (voir Chapitre III) et les autres deux mucopolysaccharides qui donnèrent par hydrolyse de l'alanine, de l'acide glutamique, de la lysine, de la glycine, de la N acetylglucosamine et de l'acide N acétylmuramique dans le rapport suivant : 2:1:1:1:1:1 pour le premier et 3:1:1:1:1:1 pour le deuxième. Ces quatre composés ne représentaient cependant que 50 % de la fraction dialysable de la paroi dégradée par le lysozyme.

B) Action du lysozyme sur les substrats solubles isolés à partir de *Micrococcus lysodeikticus*.

Meyer, Palmer, Thomson et Khorazo (1936) constatèrent qu'au bout de 64 heures d'action le lysozyme libérait environ 23 % des sucres hydrolysables par un acide à partir du substrat qu'ils avaient isolé de *Micrococcus lysodeikticus*.

Meyer et Hahnel (1946) étudièrent en détail l'action du lysozyme sur le substrat qu'ils avaient obtenu et ils contrôlèrent en particulier deux aspects par lequel se manifeste l'enzyme : la baisse de viscosité d'une solution de substrat et l'apparition de sucres réducteurs.

1) Baisse de viscosité.

Une solution de polysaccharide à 0,4 % dans du tampon citrate-phosphate 0,2 M (McIlvaine 1921) à pH 5,3, en présence de chlorure de sodium, avait une viscosité relative de 4 environ. Cette viscosité baissait par adjonction d'une solution de lysozyme dans une solution de chlorure de sodium 0,154 M. Le temps necessaire pour obtenir la moitié de la viscosité de départ etait habituellement de 7,5 minutes avec 1 $\mu$g de lysozyme cristallise pour 16 mg de substrat. Le pH optimum de cette reaction etait de 4,95 et le chlorure de sodium augmentait la vitesse de cette dépolymérisation.

2) Apparition de sucres réducteurs.

Meyer et Hahnel (1946) mesurèrent la quantité de sucres réducteurs apparue après avoir fait agir l'enzyme pendant 20 heures à 37°, sur une solution de substrat dans du tampon 0,0666 M. Le pH optimum de cette réaction était de 5, 3. Le chlorure de sodium n'influençait pas cette réaction. La quantité de fonctions réductrices libérée représentait, exprimée en glucose, 10 % du poids du substrat.

Schutte et Krisch (1958) étudièrent également l'action du lysozyme sur leur substrat. Ils observèrent une diminution de la viscosité d'une solution de substrat à 0,4 % en tampon phosphate à pH 7, diminution qui était suivie d'une apparition de sucres réducteurs et de substances donnant la réaction des acétylhexosamines selon Leloir (1944) et Cardini (1953). Dépolymérisation et apparition de fonctions réductrices étaient donc deux phénomènes consécutifs et non parallèles.

Les substances libérées par le lysozyme n'étaient dialysables que dans une proportion de 30 à 40 %, ce qui joint à la viscosité résiduelle des solutions après action du lysozyme fit supposer à ces auteurs l'existence de produits de dégradation d'un poids moléculaire encore assez élevé. La quantité de fonctions réductrices libérées exprimées en glucose représentait de 7 à 10 % du poids du substrat; 4,3 % de substances réagissant comme de l'acétylhexosamine étaient également libérées. Schutte et Krisch n'isolèrent après action du lysozyme ni glucose, ni acétylhexosamine, ni oligosaccharides réducteurs libres.

Salton et Ghuysen (Salton et Ghuysen 1959, Ghuysen et Salton 1960, Ghuysen 1960, Salton et Ghuysen 1960) ont fait agir le lysozyme sur le tétraholoside qu'ils avaient isolé à partir des parois de *Micrococcus lysodeikticus*. Ce tétraholoside avait la structure suivante

N acétylglucosamine $\beta$ (1 → 6) acide N acétylmuramique $\beta$ (1→4) N acétylglucosamine $\beta$ (1 → 6) acide N acétylmuramique.

Le lysozyme en libérait deux disaccharides dont la structure était la suivante

N acétylglucosamine $\beta$ (1 → 6) acide N acétylmuramique.

L'action $\beta$glucosaminidasique du lysozyme était ainsi démontrée par ces auteurs qui confirmèrent encore ce résultat par l'étude de l'action du lysozyme sur les di- et tétrachitobiose (Salton et Ghuysen 1959) Brumfitt et collaborateurs (1958) avaient déjà soupçonné cette action. Plus tôt encore Berger et Weiser (1957), en étudiant l'action du lysozyme sur les chitosanes, avaient déjà attribué une activité $\beta$ glucosaminidasique au lysozyme.

Le diholoside-peptide-polyholoside isolé par Ghuysen et Salton (1960) (voir chapitre III) donnait également naissance par action du lysozyme à une certaine quantité de diholosides (Ghuysen 1960). Comme par ailleurs le lysozyme n'avait aucune action sur un diholoside peptide, Ghuysen en déduisit que le lysozyme attaquait la partie polyholosidique du complexe diholoside-peptide-polyholoside.

# DEUXIEME PARTIE

# RECHERCHES PERSONNELLES

## CHAPITRE V

## TECHNIQUES ANALYTIQUES

### I. Méthodes d'identification des constituants.

Le substrat du lysozyme purifié contient des constituants glucidiques et protéiques. Leur identification a été réalisée par chromatographie sur papier. Tous les essais ont été effectués avec du papier Arches 302 sans lavage préalable. Nous avons vérifié la pureté de chacune des substances témoins par chromatographie.

#### 1) Hydrolyse.

Pour l'étude des constituants aminés du mucopolysaccharide, nous avons hydrolysé une solution de substrat à 0,5 %* dans l'eau par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 16 heures à 100°C. En effet, des conditions aussi énergiques sont nécessaires d'après Strange et Powell (1954) et Gardell (1960) pour rompre les liaisons peptidiques et celles qui existent entre les glucides aminés et les peptides.

Pour l'étude des constituants glucidiques, nous nous sommes contentés d'une hydrolyse de 2 heures par l'acide chlorhydrique 1,6 N qui d'après Montreuil et Scheppler (1959), donnerait le maximum de libération des oses.

#### 2) Séparation des acides aminés, osamines et oses.

La chromatographie des différents constituants n'est possible qu'après purification préalable de l'hydrolysat chlorhydrique. En effet la présence d'acide libre, d'ions minéraux et de produits de dégradation des protéines provoque la formation de

* Cette faible concentration est indispensable si on veut éviter des resynthèses d'oligosaccharides à partir d'oses.

traînées. Pour débarasser l'hydrolysat de ces substances, mais aussi pour séparer les acides aminés des glucides aminés et des autres glucides, les hydrolysats sont passés successivement sur Permolite 60*, échangeur de cations sous forme acide, puis sur de l'Amberlite IRA 400, échangeur d'anions sous forme formiate, d'après la technique décrite par Boulanger et collaborateurs (1952) et par Montreuil et Scheppler (1959).

La Permolite 60 fixe les acides aminés et les glucides aminés. Les premiers sont élués par une solution normale d'ammoniaque. L'éluat est évaporé sous vide, puis repris par une petite quantité d'eau et lyophilisé. Les oses aminés sont élués par de l'acide chlorhydrique 2 N (Boas 1953). Leur solution acide est également évaporée sous vide, puis reprise par de l'eau distillée et lyophilisée. Les glucides par contre ne sont pas adsorbés ni par l'échangeur de cations ni par l'échangeur d'anions. Ils se trouvent donc, après passage de l'hydrolysat sur les deux résines, dans l'effluant. Ce dernier est lyophilisé. Montreuil et Scheppler (1959) ont montré que cette technique donne une récupération totale des oses et ne provoque pas de condensation de ces composés avec les produits de dégradation des protéines.

**3) Identification des acides aminés.**

Nous les avons d'abord séparés par chromatographie unidimensionnelle sur papier. Comme les $R_f$ des acides aminés entrant dans la composition du substrat purifié étaient peu différents les uns des autres avec le solvant : butanol/acide acétique/eau 4:1:5 v/v (Slotta et Primosigh 1951), nous avons fait des chromatographies descendantes avec le solvant phénol/eau 100 . 10 v/v, en atmosphère saturée d'ammoniaque à 0,3 %, et des chromatographies ascendantes avec le solvant butanol tertiaire/méthyléthylcétone/eau/pyridine 40:40.20:4 v/v (Redfield 1953). Nous avons de plus effectué des chromatographies bidimensionnelles ascendantes avec le système méthanol/eau/pyridine 80 20.4 v/v, puis descendantes avec le système butanol/méthylethylcetone/eau/diéthylamine 40.40:20:4 v/v (Redfield 1953, Strepka 1957).

Les constituants ont été révélés à l'aide d'une pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,2 % dans l'acétone suivie d'un chauffage à 90°C.

* Résine analogue à la Permutite 50.

Nous avons recherché sur les chromatogrammes l'acide diaminopimelique par la méthode de Blass (1958).

**4) Identification des osamines.**

C'est soit de l'éluat de la colonne de permolite par l'acide chlorhydrique 2 N, soit directement de l'hydrolysat chlorhydrique que nous sommes partis. Après élimination de l'acide chlorhydrique par évaporation sous vide, nous avons effectué des chromatographies descendantes dans les systèmes suivants :

a) Butanol/acide acétique/eau 4:1:5 v/v (Partridge 1948) qui donne pour la glucosamine un $R_f$ de 0,11 et pour l'acide muramique un $R_f$ de 0,36 (Strohminger et collaborateurs 1959);

b) Phénol/eau 3:1 v/v qui donne pour la glucosamine un $R_f$ de 0,36 et pour l'acide muramique un $R_f$ de 0,49 (Strohminger et collaborateurs 1959).

Sur chaque chromatogramme, on a effectué une révélation au réactif d'Elson et Morgan (1933) suivant la technique de Partridge (1949), au nitrate d'argent ammoniacal (Partridge 1948), au phtalate d'aniline et à la ninhydrine.

**5) Identification des oses**

Les chromatographies sur papier ont été soit descendantes avec les solvants Butanol/pyridine/HCl 0,1 N 5:3:2 v/v (Bourillon et Michon 1959) et butanol/acide acétique/eau 4:1:5 v/v (Partridge 1948), soit ascendantes multiples (3 fois) avec le solvant butanol/pyridine/eau 45:25:40 (Glegg et Eidinger 1954). On a révélé les chromatogrammes soit par le réactif au phtalate d'aniline (Partridge 1949) qui donne des taches brunes après chauffage à 100°C, soit par le réactif de Cifonelli et Smith (1954).

a) *Recherches des pentoses*

Nous avons recherché les pentoses par la méthode de Dische (1949) qui les détermine en présence d'hexoses. Elle consiste à ajouter à 1 ml de la solution inconnue 4 ml d'acide sulfurique en évitant tout échauffement puis, après avoir maintenu le tout à froid pendant 1 heure, à verser 0,1 ml d'une solution aqueuse de cystéine à 3 %. On lit l'absorption à 390 et à 425 mμ. C'est la différence des deux densités optiques trouvées qui est proportionnelle à la quantité de pentoses et qui est nulle pour les hexoses même en grande quantité, les acides hexuroniques, les desoxy- et méthylpentoses en faibles quantités. Cette méthode permet donc la détermination d'acide ribonucléique en présence

de grandes quantités d'hexoses et d'acide désoxyribonucléique (Ashwell 1957).

b) *Recherche de désoxysucres*

Nous les avons recherchés par la méthode de Dische (1944) modifiée par Stumpf (1947). Elle consiste à ajouter sans refroidir 0,05 ml d'une solution de chlorhydrate de cystéine et 5 ml d'acide sulfurique à 75 % à 0,5 ml de la solution à analyser. On lit l'absorption à 490 mμ après 15 minutes. Cette réaction est déjà positive avec 25 μg d'acide désoxyribonucléique. Ni les aldopentoses ou aldohexoses, ni les désoxyhexoses ne donnent cette absorption. Cette réaction est plus sensible, d'après les auteurs, que celle à la diphénylamine qui est d'ailleurs également gênée par la présence d'autres glucides.

c) *Recherche du fructose*

Nous avons recherché les sucres cétoniques par la réaction de Dische et Borenfreund (1951). A une solution contenant 1-10μg de cétohexose, on ajoute d'abord une solution de chlorhydrate de cystéine puis de l'acide sulfurique dilué à 75 % et enfin une solution alcoolique de carbazole. Cette technique est plus sensible que la réaction à la diphénylamine de Dische (1929) et est également moins influencée par la présence de protéines ou d'acides hexuroniques (Dische 1955).

**6) Recherche des bases puriques et pyrimidiques.**

Pour caractériser un acide nucléique éventuellement présent dans notre substrat purifié, nous avons recherché les bases puriques et pyrimidiques qui pouvaient s'y trouver. Pour ce faire, nous avons utilisé les procédés d'hydrolyse décrits par Bendisch (1957). Cette hydrolyse se fait soit par l'acide perchlorique d'après la méthode de Marshak et Vogel (1951), soit par l'acide formique d'après la technique de Vischer et Chargaff (1948). Les hydrolysats ont été chromatographiés sur papier Arches 302 dans le système isopropanol/HCl 12 N/eau 65:16,8:17,3 v/v (Vischer et Chargaff 1947). Les bases se présentent en taches sombres sur un fond fluorescent quand on regarde les chromatogrammes dans une chambre noire sous une lampe à ultra-violet émettant des rayons de 260 mμ de longueur d'onde environ.

Nous avons aussi recherché les bases puriques et pyrimidiques par la méthode de Vischer et Chargaff (1948) qui consiste à asperger les chromatogrammes après les avoir lavés à l'éther, avec une solution tamponnée d'acétate mercurique. On les lave ensuite à l'eau et finalement les chromatogrammes sont trempés

dans une solution de sulfure d'ammonium. Des taches noires de sulfure mercurique indiquent l'emplacement des bases. Des quantités de l'ordre de 5 à 10 $\mu$g de chaque base peuvent ainsi être décelées.

## II. METHODES DE DOSAGES DES CONSTITUANTS

Le dosage des constituants glucidiques et protidiques pose des problèmes techniques complexes qui ne sont jamais résolus de façon parfaitement satisfaisante. Comme les techniques auxquelles nous avons fait appel sont classiques et n'ont pas subi de modifications originales de notre part, nous nous contenterons de rappeler leur principe sans entrer dans les détails opératoires, mais il nous paraît nécessaire d'en discuter un peu plus longuement la valeur.

### 1) Dosage des acides aminés.

Avant de procéder au dosage des acides aminés, il faut les libérer de la partie peptidique du mucopolysaccharide par une hydrolyse acide. De nombreux travaux (Harfenist 1953, Hirs et collaborateurs 1954, Smith et Stockell 1954, Smith, Stockell et Kimmel 1954), ont été consacrés à l'hydrolyse acide des protéines, mais aucune méthode type concernant l'hydrolyse des mucoprotéines n'a été définie. De nombreux auteurs utilisent une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N, mais aussi bien sa durée que la température à laquelle ils l'effectuent sont très variables. Un temps d'hydrolyse trop court risque de ne pas libérer tous les acides aminés de leurs combinaisons, alors qu'une hydrolyse trop longue pourrait détruire un certain nombre de ces composés (Dugan, Smith et Stockell 1954); nous avons recherché systématiquement les conditions nécessaires pour l'obtention d'une valeur maximale après avoir adopté pour des raisons de commodité la température de 100°C déjà utilisée par de nombreux auteurs (Cummins et collaborateurs 1957, Smith et collaborateurs 1956). C'est l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 16 heures au bain-marie bouillant dans des ampoules en verre pyrex scellées sous vide qui nous a donné les meilleurs résultats.

Après refroidissement, nous avons éliminé l'acide chlorhydrique en mettant l'hydrolysat dans un cristallisoir posé sur un bain-marie à 37° et placé sous un courant d'air chaud. Cette méthode permet d'obtenir très rapidement un film d'acides aminés sec au fond du cristallisoir. Ce dernier est alors placé

dans un dessicateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique pendant une nuit. L'hydrolysat repris par un peu d'eau distillée chaude est centrifugé et le surnageant reévaporé à sec. On le reprend par une quantité connue d'eau et c'est sur cette solution que nous avons dosé les acides aminés.

Nous avons utilisé la méthode de Kemble et Macpherson (1954) et celle de Moore et Stein (1948).

La première est une amélioration de la technique de Cohen (1940). Elle est basée sur le fait que la chloramine T* décarboxyle les acides aminés à la température ordinaire. Cette réaction est quantitative et semble spécifique des acides aminés libres. Les glucides aminés ne peuvent pas donner cette réaction. Le gaz carbonique produit dans la réaction est proportionnel à la quantité d'acides aminés de l'échantillon. Comme la réaction se fait à 37°C, nous avons utilisé l'appareil de Warburg et suivi le mode opératoire de Colobert (1955).

La deuxième méthode que nous avons utilisée est celle que Moore et Stein (1948) ont décrite pour le dosage des acides aminés dans les fractions obtenues lors de la séparation des acides aminés par chromatographie sur colonne. Elle est basée sur la coloration bleue que donnent les groupements aminés libres avec la ninhydrine. Le mode opératoire suivi a été celui décrit par Spies (1957). La méthode conduit à des erreurs par excès surtout dans notre cas, car les hexosamines ainsi que l'ammoniaque formée au cours de l'hydrolyse interviennent dans la réaction

**2) Dosage des oses aminés.**

Ce dosage nécessite une hydrolyse préalable du mucopolysaccharide. Cette hydrolyse doit être énergique, car certains auteurs (Gardell 1958) ont montré que, même lorsque le mucopolysaccharide était traité par l'acide chlorhydrique 6 N au bain-marie bouillant pendant 8 heures, 5 % des substances réagissant avec le réactif d'Elson et Morgan n'étaient pas encore libérées D'après certains auteurs les osamines sont très résistantes à l'hydrolyse. Ceci serait dû à la présence d'un groupement aminé en position 2 (Moggridge et Neuberger 1938). Cependant, Boas (1953), a montré que 20 % de la glucosamine étaient détruits au bout de 15 heures d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N.

* Sel de sodium de la paratoluènechloramine. Nous avons purifié le produit commercial par recristallisation dans l'eau.

Ghuysen et Salton (1960), en opérant sur des parois isolées de *Micrococcus lysodeikticus*, ont même établi que 24 % des oses aminés étaient détruits au bout de 16 heures par l'acide chlorhydrique 6 N et que le temps optimum était de 2 heures à 100°. Quant à l'acide muramique Hayashi et Barkulis (1959) ont montré qu'il était lui aussi en partie détruit par l'hydrolyse acide.

Des essais préliminaires nous ont cependant montré qu'une hydrolyse de 2 heures était nettement insuffisante : après 5 heures à 100°, l'acide chlorhydrique 6 N n'a libéré que 44 % des oses aminés libérés au bout de 16 heures par ce même acide. C'est donc ce dernier temps de 16 heures que nous avons adopté malgré la destruction qui en résulte.

Les dosages actuels des osamines dérivent presque tous de la méthode de Elson et Morgan (1933) qui utilise la réaction colorimétrique décrite en premier par Zuckerkandl et Messiner-Klebermass (1931). Elle consiste à acétyler les hexosamines, puis à faire réagir les dérivés pyroliques ou oxazoliques formés avec le réactif d'Ehrlich. Mais de très nombreuses modifications de cette technique ont été décrites (Blix 1948, Immers et Vasseur 1950, Boas 1953, Rondle et Morgan 1955, Strange et Dark 1956). Ces méthodes sont toutes plus ou moins entachées d'erreurs. Une erreur par excès provient d'abord de l'interférence des produits de dégradation des oses fortement colorés (Montreuil et Scheppler 1959). D'autre part certains oses, en présence d'acides aminés, en particulier de la lysine ou de la glycine, donnent des complexes réagissant avec le réactif d'Elson et Morgan (Gardell 1958, Montreuil et Scheppler 1959). Pour éviter cette interférence Boas (1953) propose de séparer les hexosamines par fixation sur une résine acide (Dowex 50) suivie d'élution. C'est sa technique que nous avons utilisée.

Dans le dosage colorimétrique qui suit, tous les facteurs ont une grande importance, en particulier le pH et la concentration des sels alcalins présents. C'est pourquoi les éluats doivent être soigneusement neutralisés avant le dosage. Cependant, malgré toutes ces précautions, la méthode de Boas ne donne pas encore totalement satisfaction. D'après un travail récent de Strange (1960), si elle dose bien la glucosamine, elle ne dose que 34 % de l'acide muramique présent. Ceci est dû, d'après cet auteur, à un pH trop alcalin (pH 10 au lieu de 9,6; ce dernier aurait donné 75 % d'acide muramique). Strange recommande d'effectuer le dosage d'après la méthode de Rondle et Morgan, mais en y remplaçant le tampon 0,5 N de carbonate de sodium par un tampon contenant des volumes égaux de carbonate

de sodium M et de carbonate acide de sodium M. Dans ce cas 75% de l'acide muramique sont dosés en mesurant l'absorption que donne le dérivé coloré formé à 530 mμ. Pour obtenir la valeur en acide muramique à partir de la valeur trouvée exprimée en glucosamine, il faut donc finalement encore multiplier cette dernière par 1,33.

En utilisant les meilleures conditions et sans tenir compte des pertes lors de l'hydrolyse, la détermination des osamines sera donc entachée d'une erreur par défaut d'au moins 10 %. En ce qui concerne l'acide muramique, cette erreur sera bien supérieure.

**3) Dosage des oses.**

De nombreuses méthodes de dosage colorimétrique des oses totaux ont été décrites. Souvent cependant les acides aminés interfèrent dans ces dosages. Nous nous sommes rangés aux conclusions de Sudhof et Kellner (1955 a, b) qui ont montré la grande spécificité de la méthode à l'orcinol et nous avons adopté cette technique décrite par Tillmanns et Philippi (1939) modifiée par Rimington (1940). Elle est basée sur la coloration orangée que donnent les oses à 80°C avec une solution d'orcinol dans l'acide sulfurique légèrement dilué. Elle permet de doser entre 100 et 400 μg de glucides. Il suffit d'introduire dans chaque série de dosages un témoin interne contenant une quantité connue de glucose.

Nous avons également utilisé la technique à l'anthrone décrite pour la première fois par Dreywood (1946) et adaptée par Scott et Melvin (1953). La coloration bleue que donnent les hexoses avec une solution sulfurique d'anthrone présente un maximum d'absorption à 625 mμ. On dose ainsi entre 100 et 200 μg d'hexose.

Pour les déterminations de quantités faibles de glucides, nous avons enfin adopté la méthode à l'indol-acide sulfurique, permettant de doser entre 5 et 25 μg de glucides (Dische 1955).

Ces deux dernières méthodes sont classiques. Nous ignorons cependant si les protéines et les acides aminés ne gènent pas ces dosages et y interfèrent.

**4) Dosage des fonctions réductrices.**

En hydrolysant le mucopolysaccharide, le lysozyme libère des fonctions réductrices. Nous les avons dosées par deux méthodes différentes suivant que nous avions à faire à plus ou moins de corps réducteurs libérés.

La méthode de Park et Hohnson (1949) fut celle que nous avons utilisée lors de tous nos essais de cinétique enzymatique. Elle utilise 3 réactifs :

1) une solution dans l'eau de ferricyanure de potassium à 0,5 g par litre
2) une solution contenant 5,3 g de carbonate de sodium et 0,65 g de cyanure de potassium pour 1 litre d'eau distillée
3) une solution contenant 1,5 g d'alun de fer et d'ammoniaque et 1 g de monolaurylsulfate pour un litre de solution d'acide sulfurique 0,1 N.

Les prises d'essais de 0,1 ou 0,2 ml sont ajoutées à un mélange contenant 1 ml du réactif au ferricyanure et 1 ml de la solution carbonate-cyanure. Après agitation les parois des tubes à essais sont rincées avec 0,8 ou 0,9 ml d'eau distillée. Les tubes sont ensuite placés 15 minutes au bain-marie bouillant, puis refroidis et on y ajoute 5 ml du réactif ferrique. Le tout est agité et après 15 minutes on lit l'absorption à 690 mμ que donnait la coloration bleue formée. La précision est de l'ordre de ± 0,2 μg. Cette méthode permet de doser des quantités de fonctions réductrices exprimées en glucose comprises entre 1,3 et 9μg.

Pour doser des quantités plus importantes de glucides réducteurs, nous avons utilisé la technique de Somogyi (1952) en suivant le mode opératoire de Staub (1954). Cette méthode permet de doser des fonctions réductrices exprimées en glucose allant de 50 à 1500 μg. L'erreur ne dépasse pas 10 μg exprimée en glucose.

**5) Dosage des méthylpentoses.**

Nous avons utilisé pour ce dosage la méthode de Dische et Shettles (1948) qui consiste en une application de la méthode générale de dosage des glucides par la cystéine et l'acide sulfurique. On prend, après addition des réactifs et chauffage au bain-marie bouillant, la différence des densités optiques à 396 et à 427 mμ. Cette différence est nulle pour les hexoses, pentoses, 2-désoxypentoses et acides hexuroniques, alors qu'elle est positive pour le rhamnose et le fucose. La présence de faibles quantités de protéines ne gène pas ce dosage.

# CHAPITRE VI

## EFFET DU LYSOZYME SUR LE SUBSTRAT PREPARE SUIVANT LA TECHNIQUE DE SCHUTTE ET KRISCH

### 1. Le lysozyme utilisé.

Nous avons employé le lysozyme cristallisé extrait du blanc d'oeuf de poule commercialisé par la firme Armour. Nous l'avons purifié, selon la méthode de Tallan et Stein (1953), par chromatographie sur colonne d'Amberlite XE 64 équilibrée avec le tampon phosphate monopotassique-disodique 0,2 M à pH 7,18. La zone de molarité et de pH du tampon, dans laquelle nous avons travaillé, était mesurée avec précision. D'après les travaux de Fromageot et Jollès (1953) et Jollès, Ledieu et Zuili (1959), le pH doit en effet être fixé à 0,06 près. En perfusant la colonne, après l'avoir chargée en lysozyme, avec le tampon qui a servi à son équilibrage, nous avons obtenu plusieurs fractions correspondant à des pics différents. C'est le produit correspondant au pic A, qui représentait d'ailleurs la quasi totalité de l'échantillon commercial utilisé, que nous avons dialysé pendant 48 heures, lyophilisé et conservé à +4°C pour nous en servir dans tous nos essais.

Le spectre d'absorption dans l'ultra violet d'une solution de lysozyme fut comparé à celui d'une solution contenant 5 fois 2:131 millimolécules de cystine, 5 fois 2:131 millimolécules de tryptophane et 3 fois 2:131 millimolécules de tyrosine par litre d'eau distillée, d'après la technique de Fromageot (1948). Déjà le lysozyme commercial Armour donnait des courbes d'absorption tout à fait superposables à celles de cette solution. Il en a été à fortiori de même du produit obtenu après purification. A une concentration de 200 mg par litre d'eau distillée, une solution de ce lysozyme purifié donnait à 280 mμ une densité optique de 0,41.

II. Préparation du substrat selon la technique de Schutte et Krisch.

1) *Préparation des bactéries.*

La bactérie étudiée était la souche NCTC de *Micrococcus lysodeikticus*. Nous avons cultivé les microorganismes sur un milieu solide, ce qui en facilitait la récolte. Ce milieu était composé de 18 g d'agar-agar en poudre et de 15 g de peptone trypsique par litre. Après chauffage pour dissoudre ces substances, le pH du milieu a été ramené à 7,4 avec de la soude à 50 % et on y a ajouté 1 ml par litre d'une solution de biotine à 1 % et 1 ml d'une solution de pyrocatéchol à 1 ‰ pour en favoriser la croissance. Ce milieu a été distribué à chaud dans des flacons de Roux préalablement stérilisés à sec, puis les flacons ont été restérilisés 20 minutes à 120°C à l'autoclave.

En vue de la préculture, 20 boîtes de Roux ont été ensemencés avec des bactéries développées 48 heures à 37°C sur la surface d'un tube de gélose inclinée. Les boîtes ont été amenées 48 heures à 37°C, puis les bactéries récoltées ont servi à ensemencer les cultures définitives (180 boîtes de Roux). Après 48 heures à 37°C, le développement maximum étant atteint, les microorganismes poussés à la surface du milieu ont été récoltés en employant des agitateurs recourbés et recueillis dans de l'eau distillée.

La suspension bactérienne, filtrée sur un voile de nylon pour en éliminer les parcelles de gélose, a été centrifugée. Les bactéries ont été lavées une fois avec de l'eau distillée et recentrifugées. Elles ont ensuite été traitées suivant Schutte et Krisch (1958) par 5 fois leur volume d'acétone froid pendant 24 heures à 4°C. On les a recueillies sur un filtre en verre fritté G3 et lavées par de l'acétone froid, de l'acétone-éther 1/1 et de l'éther anhydre froid avant de les sécher sous vide sur $P_2O_5$. On a ainsi obtenu une poudre bactérienne jaune.

2) *Préparation du mucopolysaccharide.*

20 g de poudre acétonique ont été mis en suspension dans 200 ml de soude 0,5 M dans des ampoules de 250 ml que l'on a scellées après y avoir fait barboter de l'azote. Après 7 jours à 29°C on a recueilli le liquide visqueux et on l'a centrifugé pendant 1 heure à 18000 tours/minute. Les 120 ml du surnageant ont été amenés à pH 4,6 avec de l'acide acétique. Il s'est formé un abondant précipité jaune que l'on a éliminé par centrifugation. Le surnageant acide a été additionné de deux fois son

volume d'éthanol absolu saturé d'acétate de potassium. Après 24 heures à 4°C aucun précipité ne s'est formé, ce qui est contraire aux résultats de Schutte et Krisch (1958), mais qui est en accord avec les affirmations de Meyer et Hahnel (1946) qui ne trouvèrent pas de mucopolysaccharides, substrat du lysozyme, dans la solution de soude qui avait servi à traiter les bactéries pendant 7 à 8 jours.

Les cellules non dissoutes par la soude après 7 jours et recueillies par centrifugation ont été à nouveau traitées par la soude 0,5 M sous azote en ampoules scellées à 29°C. Après 14 jours, la solution alcaline a été à nouveau centrifugée à 18000 tours/minute pendant 1 heure. Il n'y avait que peu d'insoluble. Le surnageant a été amené à pH 4,6 par de l'acide acétique, ce qui a entraîné la formation d'un important précipité de protéines. Ici encore nos résultats ne sont pas ceux de Schutte et Krisch qui n'obtenaient pas de précipité à ce stade de la préparation. La solution acide débarassée de ses protéines par centrifugation à été alors traitée par deux fois son volume d'alcool éthylique saturé d'acétate de potassium et mis 24 heures à 4°C. Le précipité formé a été recueilli, lavé à l'alcool puis à l'éther, redissout dans de l'eau distillée et dialysé 3 jours contre de l'eau distillée à 4°C. Une petite partie d'insoluble qui s'était formée dans le sac de dialyse a été enlevée par centrifugation, puis après acidification le mucopolysaccharide a été précipité par l'alcool saturé d'acétate de potassium, lavé et séché. Le rendement était de 2,3 g de poudre blanche peu hygroscopique pour 20 g de bactéries. Cette poudre n'était que lentement soluble dans l'eau.

Nous avons préféré remplacer dans les préparations ultérieures la dernière précipitation alcoolique par une lyophilisation, qui nous a donné un substrat bien plus facilement soluble.

### III. Effet du lysozyme sur le mucopolysaccharide préparé suivant Schutte et Krisch.

Meyer et Hahnel (1946), puis Schutte et Krisch (1958), ont décrit une double activité enzymatique du lysozyme : une activité dépolymérasique précédent une activité hydrolasique. Les deux phénomènes étant notamment distincts du fait qu'ils ne sont pas simultanés, il n'y aurait pas de libération de sucres réducteurs pendant la première phase de dépolymérisation. Nous avons tenté de vérifier l'existence de cette double activité du lysozyme que l'on a décrite chez d'autres enzymes hydrolasiques, par exemple chez les amylases.

1) *Activité dépolymérasique du lysozyme.*

D'après Meyer et Hahnel (1946), puis Schutte et Krisch (1958), la diminution de la viscosité des solutions de substrat constatée après l'addition du lysozyme serait la traduction de la dépolymérisation. Nous avons étudié cet effet sur le substrat préparé selon Schutte et Krisch. Les solutions de ce substrat de nature mucopolysaccharidique sont visqueuses. Leur viscosité relative par rapport à l'eau a été mesurée à température constante à 0,1°C près avec un viscosimètre type Lecomte de Noüy , Chaix et Verain, construit sur le principe de l'appareil de Couette et permettant des lectures instantanées au dixième de centipoise près.

Nous avons d'abord constaté que la présence de sels modifie considérablement la viscosité des solutions du substrat. Ainsi lorsque la viscosité relative d'une solution de substrat dans l'eau pure à la concentration de 3,5 mg/ml est de 3,875, elle tombe à 1,925 si cette solution contenait du chlorure de sodium 0,023 M ; une augmentation de la concentration en sel ne modifiait plus guère la viscosité. Cet effet du chlorure de sodium n'est d'ailleurs nullement spécifique et paraît simplement lié à la présence d'ions. Le chlorure de calcium le provoque également avec une intensité particulière. A la concentration 0,023 M ce sel fait tomber la viscosité relative à 1,322. Les phosphates ont un effet analogue presque aussi intense si leur concentration est suffisante : une concentration de 0,043 M en tampon phosphate monopotassique-disodique de pH 7,17 abaisse la viscosité à 1,65.

La chute de la viscosité observée lors de l'addition de sels à une solution de substrat n'est pas instantanée, mais s'établit progressivement comme le montre la figure 1, la viscosité finale apparaît comme la limite d'un processus progressif. Il est manifestement essentiel de tenir compte de ces phénomènes pour apprécier la part que peut prendre le lysozyme dans les variations observées de la viscosité.

Comme le montre la figure 2, l'addition de lysozyme à une solution de substrat dans l'eau distillée provoque une variation considérable de la viscosité du milieu, dépendant de la concentration finale en lysozyme. Les caractères de cette variation ne se distinguent en rien de ceux observés simplement par addition de sels et on était en droit de se demander s'il s'agissait là réellement d'un effet spécifique correspondant à une dépoly-

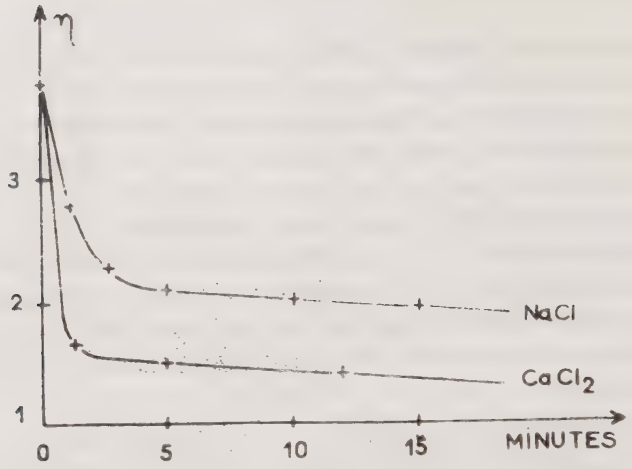



**Figure 1**

Abaissement de la viscosité d'une solution de substrat par adjonction de sels minéraux.
(16 mg de substrat lyophilisé dans 4,5 ml d'eau distillée + 0,5 ml de NaCl ou de $CaCl_2$ 0,23 M).

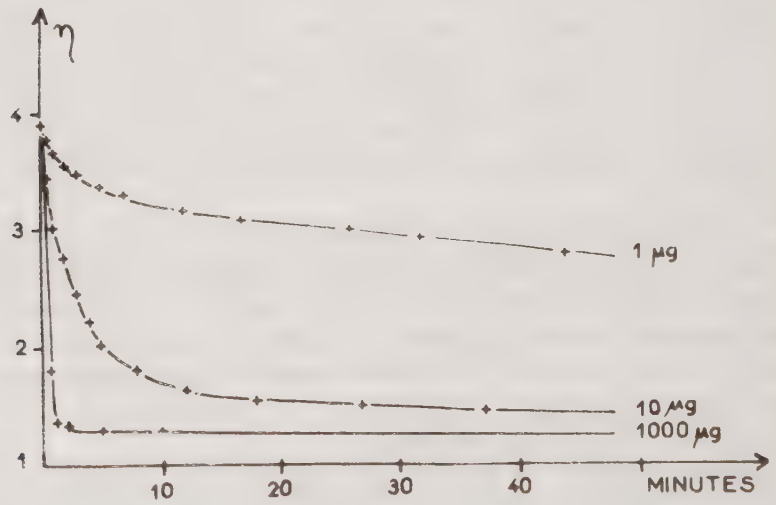



**Figure 2**

Abaissement de la viscosité d'une solution de substrat dans l'eau distillée par adjonction de lysozyme.
(16 mg de substrat lyophilisé dans 4,9 ml d'eau distillée + 0,1 ml d'une solution aqueuse de lysozyme contenant 50 µg, 500 µg et 50000 µg par ml. Le mélange réactionnel contient donc 1,10 et 1000 g de lysozyme par ml).

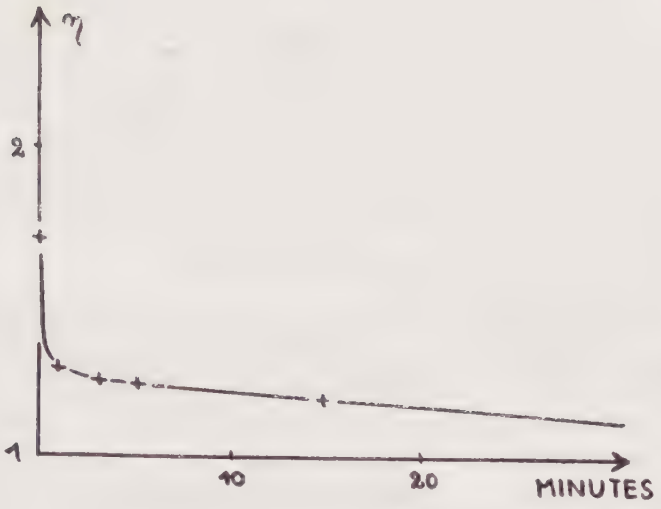



**Figure 3**

Abaissement de la viscosité d'une solution de substrat traitée préalablement par le lysozyme quand on lui ajoute du chlorure de sodium. (16 mg de substrat lyophilisé dans 5 ml d'eau distillée ont été traités par 5 $\mu g$ de lysozyme pendant 3 heures. Au temps 0 de la figure on leur a ajouté 0,1 ml de NaCl 2,15 M. Concentration du mélange en sel : 0,043 M).

mérisation comme l'admettent Meyer et Hahnel et Schutte et Krisch. De fait lorsque le lysozyme agit dans l'eau distillée jusqu'à atteindre la limite de la variation de la viscosité et qu'on ajoute alors du chlorure de sodium ou un autre sel, on provoque une nouvelle chute, brutale cette fois, de la viscosité (Figure 3).

L'effet propre du lysozyme et qui pourrait traduire l'activité enzymatique de celui-ci est très faible. En effet, si on ajoute le lysozyme après avoir obtenu l'abaissement de la viscosité du tampon phosphate 0,043 M pH 7,17, du chlorure de sodium ou du chlorure de calcium 0,043 M, on constate, comme le montre la figure 4, qu'au bout d'un temps suffisant, la viscosité du milieu finit par atteindre celle de l'eau, mais l'abaissement supplémentaire obtenu par addition de l'enzyme est faible par rapport à celui obtenu par les sels.

Le lysozyme étant une protéine basique dont le point isoélectrique se situe entre 10,5 et 11,0 (Alderton, Ward et Fevold 1945) nous avons étudié comparativement l'action de la protamine, autre protéine basique, mais sans activité enzymatique,

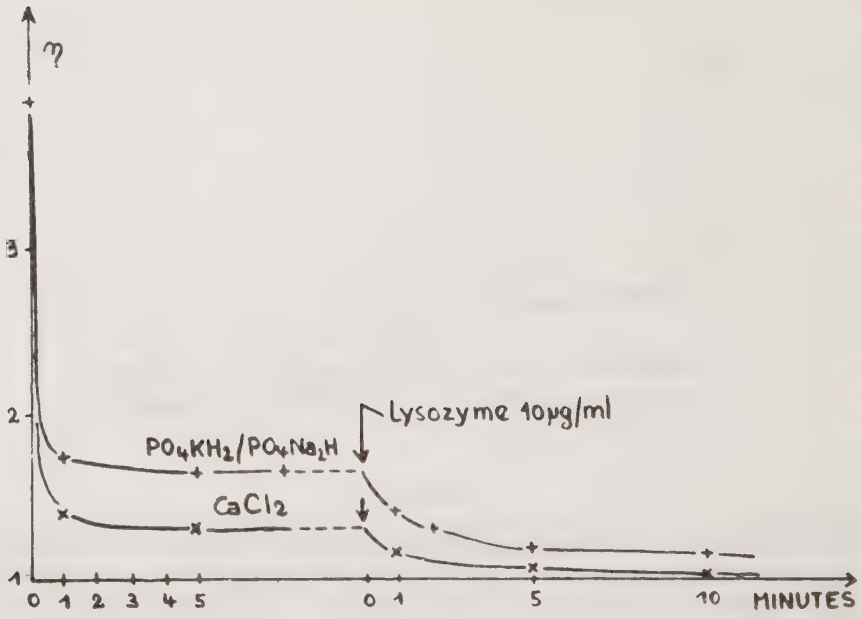



Figure 4

Effet propre du lysozyme sur le substrat.
(A 16 mg de substrat lyophilisé dans 4,5 ml d'eau distillée on a ajouté 0,5 ml de tampon phosphate ou de $CaCl_2$ 0,23 M puis après 30 minutes 0,1 ml d'une solution dans l'eau de lysozyme à 510 µg/ml).

dont le point isoélectrique se trouve voisin de 10,7 (9,7-12,4 d'après Grasman et Trumpke 1952). Nous avons opéré en milieu tamponné. Le tableau II montre que la protamine fait baisser la viscosité de la solution. Cependant il en faut 100 µg par ml pour obtenir une diminution de la viscosité qui soit comparable à celle obtenue avec 1 µg de lysozyme par ml. Cet effet est d'ailleurs plus lent qu'avec le lysozyme : une diminution de moitié de la viscosité est obtenue avec 100 µg de protamine au bout de 33 minutes, alors qu'il suffit de 10 minutes avec 1 µg de lysozyme.

Bien qu'il paraisse probable que du fait de son action enzymatique le lysozyme participe à l'abaissement de la viscosite

TABLEAU II

Abaissement de la viscosité d'une solution de substrat par adjonction de protéines basiques

(A 4,9 ml d'une solution contenant 16 mg de substrat lyophilisé dans du tampon $PO_4KH_2/PO_4Na$ H 0,0625 M pH 7,17 on a ajouté 0,1 ml d'une solution de protéine basique).

| Concentration finale en lysozyme | | en protamine | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 µg/ml | | 10 µg/ml | | 100 µg/ml | |
| temps | viscosité relative | temps | viscosité relative | temps | viscosité relative |
| 0 min. | 1,500 | 0 min. | 1,500 | 0 min. | 1,525 |
| 1 " | 1,450 | 1 " | 1,450 | 1 " | 1,512 |
| 3 " | 1,400 | 3 " | 1,400 | 9 " | 1,430 |
| 6 " | 1,337 | 6 " | 1 337 | 19 " | 1,350 |
| 12 " | 1,280 | 12 " | 1,280 | 33 " | 1,275 |
| 22 " | 1,224 | 22 " | 1,224 | 45 " | 1,225 |
| 28 " | 1,212 | 28 " | 1,212 | | |
| 75 " | 1,124 | 55 " | 1,150 | | |

du milieu réactionnel, le phénomène, de faible intensité paraît très complexe et très sensible à des facteurs non spécifiques. Puisque des baisses de viscosité aussi importantes qu'avec l'enzyme peuvent être obtenues avec des ions et particulièrement avec le chlorure de calcium, il ne paraît pas possible d'attribuer celles-ci à une activité dépolymérisante spécifique du lysozyme.

Bien que nous n'ayons pas expérimentalement cherché à préciser la nature de l'abaissement considérable de la viscosité d'une solution de substrat par les sels minéraux, il paraît possible de l'interpréter en comparant cet effet à celui bien connu des ions sur les polyélectrolytes. Certains polyélectrolytes synthétiques ont dans l'eau pure une forme relativement rigide et allongée, forme due à la répulsion coulombienne des charges de même signe. C'est le cas en particulier d'une poly 4 vinylpyridine partiellement quaternée. Ses solutions sont très visqueuses. Quand dans celles-ci on introduit des cations, ceux-ci se fixent sur les groupements carboxyliques et la répulsion intermoléculaire diminue. La molécule a alors tendance à prendre la forme d'une pelote statistique dont les solutions présentent

une viscosité bien plus faible (Eisenberg et Pouyet 1954). Il se pourrait que le substrat préparé selon Schutte et Krisch qui, ainsi que nous le verrons plus loin, contient deux substances macromoléculaires fortement acides et dont l'une au moins possède nombreux groupements carboxyliques réagisse aux cations de façon analogue à celle des polyélectrolytes synthétiques.

2) *Activité hydrolasique du lysozyme.*

Contrairement à l'activité dépolymérasique du lysozyme qui paraît illusoire, l'action hydrolasique de cette enzyme sur le substrat préparé selon Schutte et Krisch a pu être contrôlée en dosant les fonctions réductrices libérées au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Les expériences ont été conduites de la façon suivante : à 4,5 ml d'une solution à 0,4 % du mucopolysaccharide dans du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,066 M à pH 7 on a ajouté 0,5 ml d'une solution de lysozyme à 100$\mu$g/ml dans le même tampon. Après 16 heures à 37°C on a dosé les fonctions réductrices libérées (méthode de Somogyi) par rapport à un témoin "substrat sans lysozyme" et à un témoin "lysozyme sans substrat". Elles correspondaient à 850$\mu$g de glucose soit à 4,72 % du poids de substrat lyophilisé, ce qui correspondait à 5,55 % du poids de substrat sec ou encore à 12 % des glucides totaux exprimés en glucose et dosés par la méthode à l'anthrone. Le substrat lyophilisé contenait en effet 15 % d'humidité et 39,3 % de sucres totaux dosés par cette dernière méthode.

Nous avons également étudié la cinétique d'action de l'enzyme. Celle-ci a été suivie par l'augmentation du pouvoir réducteur de la solution à l'aide de la technique de Park et Johnson (1949). Les conditions opératoires furent les suivantes : à 4 ml d'une solution de substrat à 0,4 % on a ajouté 0,5 ml d'une solution de lysozyme à 90$\mu$g par ml dans une première expérience et à 900$\mu$g par ml dans une deuxième expérience. Le mélange réactionnel a été maintenu à la température de 37°C. Des prises d'essai de 0,1 ml ont été faites à des intervalles de temps déterminés. Le tableau III donne les résultats obtenus.

En conclusion le lysozyme libère 5,55 % de groupements réducteurs exprimés en glucose ce qui correspond à peu près aux résultats de Schutte et Krisch, mais cette libération est immédiate dans nos expériences, l'action hydrolasique du lysozyme se manifeste sans aucune phase de latence, dès que celui-ci est mis en présence du substrat. Ces résultats sont en contradiction avec

TABLEAU III

**Effet hydrolasique du lysozyme**

Apparition du pouvoir réducteur de solutions contenant 24 mg de substrat lyophilisé dans 4,5 ml quand on leur ajoute du lysozyme

| Temps | Expérience avec 10 µg de lysozyme par ml | | Expérience avec 100 µg de lysozyme par ml | |
|---|---|---|---|---|
| | Fonctions réductrices exprimées en µg de glucose | | Fonctions réductrices exprimées en µg de glucose | |
| | dans 0,1 ml du mélange réactionnel | pour 1 mg de substrat sec | dans 0,1 ml du mélange réactionnel | pour 1 mg de substrat sec |
| 0min.44 sec. | 0,40 | 0,88 | 0,75 | 1,65 |
| 1 " 36 " | 0,85 | 1,87 | 1,2 | 2,65 |
| 2 " 37 " | 0,86 | 1,89 | 2,2 | 4,85 |
| 3 " 22 " | 1,0 | 2,20 | 2,3 | 5,07 |
| 6 " | 1,6 | 3,53 | 3,3 | 7,28 |
| 15 " | 1,9 | 4,19 | 6 | 13,25 |
| 30 " | 2,4 | 5,3 | 8,4 | 18,54 |
| 45 " | 2,8 | 6,18 | 9,0 | 19,86 |

ceux de Schutte et Krisch qui ne voyaient apparaître des substances réductrices qu'après avoir laissé agir le lysozyme pendant quelques heures sur leur mucopolysaccharide.

La variation de viscosité n'étant pas spécifique d'une part, la libération de sucres réducteurs apparaissant dès l'addition d'enzyme d'autre part, il ne paraît pas possible de soutenir l'existence d'une activité dépolymérasique distincte de l'activité hydrolasique.

---

# CHAPITRE VII

## ISOLEMENT D'UN SUBSTRAT DU LYSOZYME CHROMATOGRAPHIQUEMENT PUR

La nécessité d'avoir un substrat pur afin d'étudier l'action enzymatique du lysozyme nous a conduit à soumettre le produit préparé selon Schutte et Krisch à une microélectrophorèse en veine fluide dans les conditions suivantes : Une solution de substrat à 16 mg/ml dans du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,025 M à pH 7,17 a été dialysée pendant 60 heures à 4°C contre 20 fois son volume de tampon. On a changé 4 fois la solution tampon. La microélectrophorèse a été réalisée dans l'appareil de Kern où le gradient d'indice de réfraction est évalué par l'observation de franges d'interférence. La tension utilisée était de 70 volts, l'ampérage de 2,8 milliampères. Dans ces conditions on a pu distinguer deux constituants à charge nette fortement négative, dans le rapport quantitatif apparent de 3 à 8.

Les résultats de la microélectrophorèse nous ayant montré que le substrat du lysozyme préparé selon la technique de Schutte et Krisch était un mélange de 2 corps, nous avons essayé de les séparer :

**1) Précipitation fractionnée avec du chlorure de dodécyldiméthylbenzylammonium (catigène).**

A la suite de certains travaux (Foster, Newton, Hearn et Stacey 1956), signalant la précipitation des complexes que donnent des mucopolysaccharides acides avec les borates par le bromure de cétyltriméthylammonium (Dutta, Jones et Stacey 1953), nous avons essayé de fractionner le substrat avec un ammonium quaternaire en présence de borates.

La concentration de la solution de substrat dans le tampon acide borique-KCl-NaOH 0,06 M à pH 8 selon Soerensen étant de 0,04 %, on a obtenu la précipitation d'une fraction de ce substrat quand la concentration en catigène de la solution augmentait de 0,032 à 0,096 %. Au-dessus de 0,096 % une nouvelle adjonction de catigène ne provoquait plus de précipitation. La fraction précipitée par le catigène représentait 58 % des sucres

totaux du substrat de départ (évalués par la méthode à l'anthrone et exprimés en glucose).

Cependant, ni le précipité redissous dans une solution saturée d'acétate de potassium puis dialysé, ni le surnageant lui aussi dialysé jusqu'à disparition du catigène et lyophilisé, ne furent sensibles à l'action du lysozyme (pas de libération de fonctions réductrices sous l'action de cet enzyme).

Le mucopolysaccharide, substrat du lysozyme avait donc dû être dénaturé par action du catigène. Certains auteurs ont par ailleurs signalé des dénaturations de ce genre par des ammonium quaternaires (Stacey 1958).

II) **Essais de précipitation fractionnée par de l'alcool en présence d'acétate de zinc.**

Ces essais ne conduisirent à aucune séparation.

III) **Essai d'adsorption sur charbon (Norit S X 11).**

Norit S X 11 : commercialisé par United Norit Sales Corporation Ltd., Amsterdam.

On a adsorbé le substrat sur le charbon lavé par l'acide chlorhydrique N puis par de l'eau. Il s'y est entièrement fixé, mais nous n'avons réussi à en éluer aucun des constituants fixés.

IV) **Essais d'adsorption sur celluloses échangeuses d'anions.**

1) *Cellulose Ecteola* (Cellulose contenant des groupes basiques de la triéthanolamine liés à la cellulose par la réaction à l'épichlohydrine)*.

Cette cellulose équilibrée avec un tampon phosphate monopotassique-disodique 0,066 M de pH 7,17 n'a fixé aucun constiant du substrat.

Equilibrée avec un tampon carbonate de sodium-bicarbonate de sodium 0,05 M de pH 9, elle n'a pas non plus fixé de substrat.

2) *Diéthylaminoéthylcellulose.*

Cette cellulose** a été lavée avec une solution normale d'acide chlorhydrique puis par de l'eau bidistillée jusqu'à disparition de l'ion $Cl^-$ et enfin équilibrée contre du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,066 M à pH 7,17.

* Selectacel Ecteola commercialisé par Brown Company, Berlin, USA.

** Selectacel DEAE commercialisé par Brown Company, Berlin USA.

Nous les avons chargées avec 6 ml d'une solution de substrat lyophilisé à 0,04 % dans du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,066 M à pH 7,2. Cette solution avait une teneur en glucides totaux dosés à l'anthrone correspondant à 9,43 mg de glucose.

Les colonnes ont été perfusées avec du tampon phosphate monopotassique-disodique 0,066 M à pH 7,2 et des fractions de 3 ml ont été recueillies. On y a dosé les sucres totaux par la méthode à l'anthrone. Le tableau IV donne les résultats obtenus.

**TABLEAU IV**

**Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose du substrat du lysozyme préparé selon Schutte et Krisch**

Dosage des sucres totaux dans les fractions de perfusion par un tampon phosphate monopotassique-disodique 0,066 M à pH 7,2 de 2 colonnes de DEAE cellulose chargées avec le substrat du lysozyme préparé selon Schutte et Krisch

| Colonne de 6,4 mm de diamètre | | | Colonne de 11,2 mm de diamètre | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Fractions | Volume en ml | Sucres totaux en mg glucose | Fractions | Volume en ml | Sucres totaux en mg glucose |
| 1 et 2 | 7 | 0 | 1 à 5 | 19 | 0 |
| 3 | 3 | 0,745 | 6 | 3 | 0,1347 |
| 4 | 3 | 1,556 | 7 | 3 | 0,651 |
| 5 | 3 | 0,636 | 8 | 3 | 1,238 |
| 6 | 3 | 0,099 | 9 | 3 | 0,905 |
| 7 | 3 | 0,071 | 10 | 3 | 0,299 |
| 8 | 3 | 0,219 | 11 | 3 | 0,075 |
| 9 | 3 | 0,064 | | 3 | 0,019 |
| 10 | 3 | 0,028 | | 3 | 0,014 |
| 11 | 3 | 0 | | 3 | 0 |
| Total mucopolysaccharides élués : **3,418 = 42 %** | | | Total mucopolysaccharides élués en glucose : **3,336 = 41 %** | | |

Ces résultats indiquent que la DEAE cellulose ne retient pas l'une des fractions composant le substrat préparé selon Schutte et Krisch. Celle-ci représente 42 % des sucres totaux mis sur sur la colonne.

Pour éluer la fraction restée sur la colonne, nous y avons fait passer une solution de citrate disodique 0,1 M dont le pH était graduellement abaissé par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M.

On a recherché les sucres par la méthode à l'anthrone dans les fractions de 3 ml recueillies au collecteur de fractions. On y a aussi mesuré les pH. C'est au pH 2,8 qu'apparurent les premières fractions donnant une réaction positive à l'anthrone. Le pH étant alors maintenu constant, une deuxième fraction mucopolysaccharidique, qui représentait 58 % des sucres totaux mis sur la colonne, a ainsi été éluée.

Dans les fractionnements ultérieurs du substrat préparé selon Schutte et Krisch, après avoir élué la première fraction avec le tampon à pH 7,2, nous faisions passer immédiatement le tampon citrate HCl 0,1 M à pH 2,8 qui éluait la deuxième fraction. Nous avons couramment utilisé une colonne de 1 cm de diamètre et de 27 cm de hauteur pour fractionner 100 mg de substrat impur.

Après dialyse contre de l'eau distillée à 4°C pendant 48 heures, les deux fractions étaient lyophilisées.

Suivant les différentes préparations de substrat, nous avons obtenu des pourcentages assez différents entre les deux fractions. Ils ont varié de 42 à 63 % pour la première fraction et de 37 à 58 % pour la deuxième. Cela signifiait que les bactéries suivant le cas produisent plus ou moins de mucopolysaccharides, résultat qui a été signalé par d'autres auteurs (Litwack et Pramer 1956, Reimer et Litwack 1958, Reimer et Litwack 1961).

Ces différences pourraient cependant aussi tenir à des variations survenues au cours de l'hydrolyse des bactéries par la soude certainement influencée par des traces d'oxygène pouvant se trouver en plus ou moins grandes quantités à l'intérieur des ampoules scellées où nous effectuions la préparation.

En moyenne, cependant, c'est autour de 50 % que se situaient les deux fractions.

**V) Action du lysozyme sur les deux fractions obtenues sur colonne de DEAE cellulose.**

Les deux fractions ont été dissoutes chacune dans 4 ml de tampon phosphate monopotassique-disodique de telle sorte que les solutions ainsi obtenues titraient 0,54 mg de sucres totaux dosés par la méthode à l'orcinol et exprimés en glucose. On leur a ajouté 0,5 ml d'une solution de lysozyme à 100 $\mu$g/ml dans le même tampon. Après 16 heures à 37° on a dosé les sucres réducteurs apparus dans 4 ml de ce milieu, par la méthode de Somogyi (1952). Parallèlement à ces essais, on a utilisé des témoins dans lesquels le lysozyme n'a été ajouté qu'après la solution cuivrique servant au dosage des glucides.

La fraction éluée de la colonne à pH 7,2 n'a donné lieu par action du lysozyme à aucune libération de fonctions réductrices.

Par contre le lysozyme a libéré à partir de la fraction éluée à pH 2,8 un certain nombre de fonctions réductrices, qui exprimées en glucose correspondaient à 1,055 mg pour 1,728 mg de sucres totaux exprimés en glucose et dosés par la méthode à l'orcinol. Or cette fraction contenait 25,23 % de sucres totaux dosés par cette méthode.

Les fonctions réductrices, exprimées en glucoses libérées à partir de cette fraction par le lysozyme représentent donc 15,39 % du poids sec de cette fraction. C'est donc le mucopolysaccharide élué à partir de la colonne de DEAE cellulose à pH 2,8 qui représente le substrat du lysozyme.

Nous avons également fait un essai viscosimétrique sur ce substrat. A 4,5 ml d'une solution contenant 8,54 mg de substrat sec dans l'eau distillée, amenée à pH 7,2, on a ajouté 0,5 ml d'une solution de lysozyme à 100 $\mu$g par ml. Le tableau V donne la baisse de viscosité enregistrée.

TABLEAU V

**Abaissement de la viscosité d'une solution de substrat purifié par chromatographie par l'action du lysozyme(100 $\mu$g/ml de Concentration en enzyme)**

| Temps en minutes | 0 | 2 | 4 | 8 | 15 | 20 | 55 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Viscosité relative | 1,63 | 1,56 | 1,49 | 1,43 | 1,38 | 1,36 | 1,355 |

En conclusion nous avons réussi à purifier le substrat brut de Schutte et Krisch en éliminant par chromatographie sur DEAE une fraction représentant à peu près la moitié du produit initial, non hydrolysable par le lysozyme, l'autre fraction représentant par conséquent un substrat purifié du lysozyme.

# CHAPITRE VIII

## COMPOSITION CHIMIQUE DU SUBSTRAT DU LYSOZYME PURIFIE PAR CHROMATOGRAPHIE

**1) Analyse qualitative.**

Le substrat purifié contient des sucres, des sucres aminés et des acides aminés que nous avons pu mettre en évidence par les techniques déjà décrites.

a) *Sucres.*

Après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 1,6 N pendant 2 heures au bain-marie bouillant et passage sur colonnes d'échangeurs de cations et d'anions suivant la technique de Montreuil et Scheppler (1959), nous avons décelé par chromatographie sur papier, dans les 3 systèmes de solvants décrits, du glucose en quantité importante et du fucose en faible quantité.

b) *Sucres aminés.*

Après une hydrolyse de 16 heures par l'acide chlorhydrique 6 N à 100° en ampoules scellées, les sucres aminés ont été chromatographiés dans les deux systèmes de solvants décrits. Nous avons ainsi caractérisé de la glucosamine et de l'acide muramique.

c) *Acides aminés.*

Une solution de substrat à 0,1 % dans l'acide chlorhydrique 6 N a été portée, en ampoule scellée, pendant 8 heures à 100°C, puis traitée suivant la technique de Boulanger, Bizerte et Courtot (1952). Les acides aminés ont été séparés et caractérisés par chromatographie sur papier dans 5 systèmes de solvants différents. Nous avons ainsi mis en évidence de l'alanine, de l'acide glutamique et de la lysine en quantité importante, ainsi que du glycocolle en quantité plus faible.

**2) Analyse quantitative.**

Le produit lyophilisé contenait toujours une certaine quantité d'eau que nous avons déterminée par déshydratation à 100° jusqu'à poids constant (4 heures). L'humidité trouvée était de

23,5 % Les pourcentages ci-dessous se réfèreront au poids sec

Le microdosage de l'azote total a été réalisé sur une prise d'essai de 2 mg suivant la technique de Marckham (1942). Le taux d'azote trouvé est de 1,803 mole pour 1 mole de glucose.

Le phosphore total a été dosé dans une prise d'essai de 6,1 mg après hydrolyse perchlorique par la méthode de King (1932). Le taux trouvé est de 0,149 %.

Les oses totaux ont été dosés directement sans hydrolyse préalable par la méthode à l'orcinol (Rimington 1940) et par la méthode à l'anthrone (Scott et collaborateurs 1953). Nous avons trouvé respectivement 25,23 et 23,71 % exprimés en glucose.

Le fucose dosé par la méthode de Dische et Schettles (1948) représentait 0,283 % du poids sec du substrat, soit 1 molécule pour 81 molécules de glucose.

Les hexosamines ont été dosées en suivant le mode opératoire décrit par Boas (1953) après une hydrolyse de 16 heures par l'acide chlorhydrique 6 N à 100° en ampoules scellées. Dans ces conditions, le taux de sucres aminés trouvé était de 24,44 %, c'est-à-dire dans le rapport molaire de 1,05 par rapport au glucose.

Les acides aminés ont été dosés après hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 6 N à 100° pendant 16 heures. En effectuant le dosage par la méthode de Kemble et McPherson (1954), on trouve un taux de 8,76 %, soit 0,477 moles pour 1 mole de glucose, ce qui, exprimé en poids moléculaire moyen d'acide aminé (113,3), nous donne un pourcentage de 7,56. En dosant les groupements aminés après hydrolyse, par la méthode à la ninhydrine (Moore et Stein 1948), nous en avons trouvé 1,8 moles pour 1 mole de glucose. Si l'on admet que l'on titre ainsi tous les groupements aminés on peut, en en déduisant ceux appartenant aux acides aminés (0,495) (correction faite d'après Moore et Stein 1951), trouver les groupements dus aux hexosamines, soit 1,405 moles par mole de glucose. Cette valeur exprimée en glucosamine représente 32 % du poids sec du substrat. Ce taux est très supérieur comme on s'y attendait à celui que nous avons trouvé quand le titrage était fait par la méthode d'Elson et Morgan modifiée par Boas (1,05 mole par mole de glucose).

Une recherche de pentose faite sur notre substrat par la méthode de Dische (1949) a été négative.

Epstein et Chain (1940) ayant soupçonné dans leur substrat la présence d'un cétohexose, nous avons recherché ce sucre dans

notre mucopolysaccharide par la méthode de Dische et Borenfreund (1951). Le dosage a été fait sur 3 mg de substrat. La sensibilité de la méthode est de 1 $\mu$g de cétohexose Nous n'avons obtenu aucune coloration à 560 m$\mu$ par rapport à un témoin

Schutte et Krisch ayant soupçonné dans leur substrat la présence de 6 à 7 % d'acide désoxyribonucléique, nous avons recherché les désoxysucres par la méthode de Dische (1944) sur 4,427 mg de substrat sec. La densité optique que nous avons trouvée à 490 m$\mu$ étant de 0,015 par rapport à un témoin contenant de l'eau, cela nous permet d'affirmer que dans notre substrat il y avait moins de 25 $\mu$g d'acide désoxyribonucléique pour 4,427 mg de substrat sec, soit moins de 0,56 % d'acide désoxyribonucléique.

C'est l'étude du spectre d'absorption dans l'ultraviolet de leur substrat qui avait amené Schutte et Krisch à soupçonner la présence d'acides nucléiques En effet, en solution aqueuse à 0,02 %, leur mucopolysaccharide avait un maximum d'absorption à 260 m$\mu$ et un minimum à 235 m$\mu$. Notre mucopolysaccharide présentait lui aussi une absorption dans l'ultraviolet. A la concentration de 0,02 % dans l'eau distillée, il avait un maximum d'absorption à 256 m$\mu$ et un minimum à 246 m$\mu$. La différence des densités optiques entre ces deux absorptions était de 0,013, alors que chez Schutte et Krisch elle était de 0,175 environ. Le tableau VI indique les absorptions que donnait une solution de notre substrat dans l'eau, ainsi qu'à pH acide et qu'à pH basique.

Pour contrôler l'absence d'acides nucléiques, nous avons recherché la présence de bases puriques et pyrimidiques dans un hydrolysat acide Nous avons constaté qu'après un traitement par l'acide perchlorique ou par l'acide formique, l'hydrolysat du substrat ne présentait plus ni minimum ni maximum d'absorption dans l'ultraviolet. En plus, nous n'avons jamais décelé de bases puriques ou pyrimidiques sur les chromatogrammes de ces hydrolysats acides.

D'où provient alors le spectre d'absorption de notre substrat dans l'ultraviolet ? Nous avons pensé qu'il était possible que ces caractères d'absorption soient liés à des modifications de structure des glucides ou de leurs dérivés aminés au cours du processus d'extraction du substrat à partir de la paroi des bactéries.

De fait, dans la zone des pH acides une solution de glucosamine à 1 % présente un minimum d'absorption à 252 m$\mu$ et un

TABLEAU VI

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet d'une solution de substrat purifié par chromatographie à 0,02 g pour 100

| Longueur d'onde | Solution dans l'eau D.O. | Solution dans HCl 0,1 N D.O. | Solution dans NaOH 0,1 N D.O. |
|---|---|---|---|
| 210 | 1,2 | 0,95 | 0,97 |
| 215 | 0,72 | 0,60 | 0,67 |
| 220 | 0,43 | 0,39 | 0,47 |
| 225 | 0,29 | 0,275 | 0,27 |
| 230 | 0,21 | 0,18 | 0,172 |
| 234 | 0,165 | 0,155 | 0,135 |
| 238 | 0,14 | 0,134 | 0,117 |
| 240 | 0,135 | 0,129 | 0,114 |
| 242 | 0,135 | 0,129 | 0,114 |
| 244 | **0,132** | **0,122** | 0,106 |
| 246 | 0,134 | **0,122** | 0,105 |
| 248 | 0,137 | 0,125 | **0,102** |
| 250 | 0,142 | **0,128** | **0,106** |
| 254 | **0,142** | **0,128** | 0,103 |
| 256 | **0,145** | **0,128** | 0,103 |
| 258 | 0,136 | 0,116 | 0,098 |
| 260 | 0,122 | 0,105 | 0,087 |
| 264 | 0,110 | 0,090 | 0,085 |
| 268 | 0,087 | 0,065 | 0,070 |
| 270 | 0,084 | 0,065 | 0,066 |
| 275 | 0,075 | 0,058 | 0,063 |
| 280 | 0,066 | 0,054 | 0,056 |
| 285 | 0,060 | 0,048 | 0,053 |
| 290 | 0,050 | 0,045 | 0,048 |

maximum à 275 mμ. En traitant une telle solution par de la soude 0,5 N en ampoules scellées sous azote pendant 15 jours à 29° (conditions qui sont celles de l'hydrolyse alcaline que nous utilisons pour extraire le mucopolysaccharide à partir des bactéries) et en comparant cette solution alcaline à une autre conservée en présence d'air, nous avons constaté des changements spectaculaires dans les spectres d'absorption de la glucosamine. L'intensité de l'absorption augmente considérablement. De plus il apparaît dans la solution conservée en pré-

sence d'air un nouveau maximum d'absorption à 300 mμ quand on lit l'absorption aux pH basiques. Ces maxima ne coïncident cependant pas avec ceux que nous avons observé dans le cas du mucopolysaccharide.

D'autres auteurs (Barkulis et Jones 1957) ont également signalé la présence dans les parois de *Micrococcus lysodeikticus* de constituants absorbants à 260 mμ qui ne paraissent pas être de nature nucléotidique.

Les observations faites avec la glucosamine, montrant l'importance de l'oxydation au cours de l'hydrolyse alcaline nécessaire pour extraire le mucopolysaccharide à partir des parois de *Micrococcus lysodeikticus*, sont peut être à rapprocher du fait que le substrat purifié au cours de la conservation même à froid, mais en présence d'air, peut perdre la propriété de libérer des produits réducteurs par action du lysozyme.

*CONCLUSION*.

Ainsi qu'il ressort du tableau VII, qui résume nos résultats, le substrat purifié du lysozyme que nous avons obtenu a une composition se rapprochant de celle donnée par Cummins et Harris (1956), Perkins et Rogers (1958), Salton et Pavlik (1960) pour les parois isolées de *Micrococcus lysodeikticus*. Il diffère par contre notablement des substrats décrits par Epstein et Chain (1940) et Schutte et Krisch (1958). Il ne contient ni cétohexose, ni mannose, ni acides nucléiques. Il s'agit d'un glycopeptide.

Dans son ensemble, il a une composition du type de celle prêtée par Work (1957) au "constituant fondamental de la structure pariétale" ainsi appelé parce qu'il semble exister aussi bien dans les parois des bactéries à gram positif que des bactéries à gram négatif et par sa polymérisation constituer le support des propriétés mécaniques de la paroi notamment de la forme de la bactérie et de sa rigidité. Dans ces conditions, on comprend comment l'hydrolyse du substrat par le lysozyme aboutit à la destruction de la paroi et à la lyse consécutive.

C'est cette hydrolyse que nous nous sommes attachés à étudier plus en détail.

TABLEAU VII

Composition chimique du substrat du lysozyme purifié par chromatographie sur colonne

| Constituants | rapport molaire | grammes pour 100 |
|---|---|---|
| Oses totaux (1) | 1 | 25,23 |
| Fucose | 0,0123 | 0,283 |
| Hexosamines dosées (2) | 1,05 | 24,44 |
| Hexosamines calculées (2) | 1,305 | 32,7 |
| Hexosamines calculées (3) | 1,305 | 46,9 |
| Acides aminés totaux (4) (5) | 0,477 | 7,56 |
| Phosphore total | 0,048 | 0,149 |
| Azote total | 1,803 | 3,534 |

(1) oses totaux (glucose + fucose) exprimés en glucose

(2) exprimés en glucosamine

(3) exprimés en poids moléculaire moyen de N acétyl hexosamine = 1/2 poids moléculaire de N acétyl glucosamine + 1/2 poids moléculaire d'acide N acétyl muramique

(4) exprimés en poids moléculaire moyen d'acide aminé d'après (5)

(5) P. Jolles a établi que les acides aminés se trouvaient dans le rapport molaire suivant : alanine 2,0; acide glutamique 1,05; lysine 0,62; glycine 0,2.

---

| | |
|---|---|
| constituants identifiés par chromatographie sur papier | glucose |
| | fucose |
| | glucosamine |
| | acide muramique |
| | acide glutamique |
| | alanine |
| | lysine |
| | glycine |

---

# CHAPITRE IX

## CINETIQUE ENZYMATIQUE

Nous avions trois possibilités pour étudier la cinétique enzymatique de l'action du lysozyme sur notre substrat. D'abord celle qui consiste à étudier la libération de matériel réagissant à la manière de la glucosamine ainsi que le suggérèrent Brumfitt, Wardlaw et Park (1958). Cependant Perkins (1960 b) a montré que cette coloration était due en partie à un artefact (Immers et Vasseur 1950). Ce seraient les groupements réducteurs des sucres aminés libérés par le lysozyme qui, réagissant avec les groupements $NH_2$ libres de la lysine (Ingram et Salton 1957), donneraient un composé donnant cette coloration.

Une deuxième méthode d'étude aurait consisté à étudier l'apparition au cours de la réaction enzymatique, de matériel réagissant à la réaction d'Elson et Morgan (1933) pour la N acétylglucosamine suivant la technique modifiée par Aminoff et collaborateurs (1952). C'est ce que firent Schutte et Krisch (1958) avec une méthode légèrement différente (Morgan et Elson 1934, modifiée par Ogston et Stanier 1950). Le principe de ces dosages consiste à chauffer la substance dans une base diluée : carbonate de sodium (Elson et Morgan 1933) ou borate de sodium (Reissig, Strominger et Leloir 1955). Il se forme alors des hétérocycles qui réagiront dans le même temps avec la paradiméthylaminobenzaldéhyde pour donner des composés colorés. Or Perkins (1960 b) a constaté que, lors du traitement alcalin, de petites molécules de la paroi bactérienne, libérées par les bases par hydrolyse dans les conditions de l'essai, donnent des groupements N acétylglucosaminiques et N acétylmuramiques libres qui sont rapidement transformés en chromogènes. La quantité de 'N acétylhexosamines' estimée par cette technique dépend donc du degré de l'hydrolyse alcaline et reflète assez mal la cinétique enzymatique.

Nous avons donc eu recours à la technique de dosages des fonctions réductrices libérées par l'enzyme. En effet, Berger et Weiser (1957), puis Salton et Ghuysen (1959) démontrèrent

l'action $\beta(1 \rightarrow 4)$ glucosaminidasique du lysozyme, amenant la libération d'une fonction réductrice. D'autres auteurs Meyer, Palmer, Thomson et Khorazo (1936), Epstein et Chain (1940), Meyer et Hahnel (1946), Schutte et Krisch (1958) et Salton (1956) ont également utilisé cette technique. Les trois premiers cependant dosaient les fonctions réductrices libérées par l'enzyme au bout de 16 à 20 heures sur un substrat mucopolysaccharidique, Schutte et Krisch (1958) ne virent apparaître des groupements réducteurs qu'au bout de quelques heures. Enfin Salton travaillant sur des parois bactériennes isolées dosa les substances réductrices apparues dans la suspension de parois. Au bout d'une heure déjà des sucres réducteurs apparaissaient dans cette suspension.

## I. Conditions expérimentales.

Après des essais préliminaires, les conditions de nos expériences ont été normalisées de la manière suivante .

A 1 ml de solution dans l'eau de substrat purifié contenant 3,1 mg de substrat lyophilisé (2,36 mg de substrat sec), on ajoute 0,5 ml de tampon 0,2 M convenablement choisi (phosphate monopotassique-disodique d'après Sorensen (1909), véronal sodique-HCl d'après Michaelis (1930) ou acétate de sodium-acide acétique d'après Walpole (1914) suivant les besoins) contenant ou non du chlorure de sodium. Après équilibrage de température dans un bain-marie à 37°C, on ajoute 0,5 ml de la solution de lysozyme dans l'eau à la concentration de 400 $\mu$g/ml équilibrée à 37°C. La concentration en lysozyme est donc de 100 $\mu$g/ml pour 1,18 mg de substrat sec.

L'hydrolyse est suivie à 37°C en prélevant des échantillons de 0,2 ml à des instants déterminés et en les versant immédiatement dans le réactif alcalin au ferricyanure utilisé dans la microméthode de Park et Johnson (1949). C'est le temps de mise en contact du mélange réactionnel avec le réactif qui a été pris comme temps de la réaction.

Le réactif bloque l'activité de l'enzyme. On peut alors attendre quelques minutes avant de poursuivre le dosage des fonctions réductrices libérées par la méthode décrite. Il faut cependant conserver les échantillons à froid et surtout à l'abri de la lumière solaire.

Parallèlement à ces essais, nous avons fait des "témoins substrat" et des "témoins lysozyme". Dans les résultats figu-

rant dans nos tableaux, ces témoins sont toujours déduits. Notre substrat avait au départ un certain pouvoir réducteur équivalent à 0,018 µmoles de glucose par mg de substrat sec (densité optique de 0,065 après dosage selon Park et Johnson pour 0,2 ml de prise d'essai du milieu réactionnel). Ce faible pouvoir réducteur a aussi été signalé par Salton (1956) pour une suspension de parois isolées de *Micrococcus lysodeikticus*. La méthode de dosage donnait une densité optique de 0,10 pour 1,33 µg de glucose.

Fleming et Allison (1922) avaient déjà signalé qu'une concentration en chlorure de sodium de 0,5 % favorisait la lyse par le lysozyme des bactéries entières alors qu'une concentration supérieure inhibait cette action. Boasson (1938) montre également l'inhibition de la lyse par un excès de chlorure de sodium. Lobstein et Fogelson (1951), en dosant l'enzyme par la méthode de Smolelis et Hartsell (1949), constatèrent que c'est la concentration en NaCl de 0,071 à 0,1 N qui favorise le plus l'action du lysozyme. Une concentration supérieure ou inférieure la ralentit. Smolelis et Hartsell (1952) constatèrent également un optimum de concentration entre 0,05 et 0,12 M, mais remarquèrent qu'à force ionique égale le chlorure de potassium ou le sulfate de potassium peuvent jouer le même rôle. Wilcox et Daniel (1954) étudièrent également l'influence des ions surtout sur l'inhibition paradoxale par excès d'enzyme. Enfin Colobert (1957) et Colobert et Lenoir (1957) confirmèrent ces résultats et établirent qu'il convenait de distinguer dans la lyse une phase initiale ne représentant que le dixième environ de la chute totale de la densité optique, de durée très courte de l'ordre de quelques secondes dans les conditions habituelles, au bout de laquelle la dissolution totale des parois des bactéries est complètement achevée. Les auteurs appelèrent cette phase "la phase spécifique". Le lysozyme n'intervient absolument plus dans la suite de la clarification des suspensions, qui correspond à la dispersion du protoplasme libéré par la destruction de la paroi. Ils ont établi que la concentration optimale en chlorure de sodium pour la phase spécifique était beaucoup plus faible que celle valable pour la deuxième phase et qu'elle variait avec la concentration en lysozyme. Elle est d'autant plus élevée que la concentration en enzyme est elle-même plus élevée. Il n'est d'ailleurs pas nécessaire de faire appel aux sels neutres pour obtenir ce résultat, l'augmentation de la concentration molaire du tampon permet également de la réaliser.

Ces études furent effectuées sur des bactéries entières dont les suspensions étaient plus ou moins vite clarifiées par action du lysozyme. En ce qui concerne les substrats solubles, Meyer et Hahnel signalèrent que le chlorure de sodium n'avait pas d'influence sur l'hydrolyse de leur substrat, mais cette hydrolyse n'était mesurée, par l'apparition de substances réductrices, que 20 heures après avoir mis en contact enzyme et substrat.

A la suite de ces différents travaux, nous avons toujours réalisé nos expériences à force ionique variable, ordinairement par addition de chlorure de sodium.

## II. Caractères généraux de la réaction.

### 1) *Influence du pH et du chlorure de sodium.*

Les vitesses initiales d'hydrolyse ont été déterminées aux différents pH avec ou sans chlorure de sodium à la concentration 0,0625 M qui, au pH optimum, détermine la vitesse initiale maximum.

Le tableau VIII et les figures 5 et 6 donnent quelques cinétiques à des pH compris entre 3,5 et 8,6 avec ou sans chlorure de sodium, pour une concentration en lysozyme de 100 $\mu$g/ml de mélange réactionnel en tampon 0,05 M. Le tableau IX présente les résultats obtenus à 4 pH différents en présence ou en l'absence de chlorure de sodium avec une concentration en enzyme de 50 $\mu$g/ml.

Les figures 7 et 8, tirées du tableau VIII, permettent de comparer les cinétiques suivant le pH en présence et en absence de chlorure de sodium 0,0625 M. Nous voyons qu'aux pH 3,60 et au pH 5,3 (pH optimum), le chlorure de sodium augmente la vitesse de la réaction alors qu'aux pH 6,50 et 7,44 cela n'est plus le cas.

Afin de rendre ces résultats plus parlants, nous avons établi la courbe exprimant les vitesses initiales d'hydrolyse en fonction du pH (tableau X, figure 9). Nous avons exprimé la vitesse initiale de la réaction par la quantité de sucres réducteurs libérés en 17 secondes 5 dixièmes. Pendant ce temps, en effet, la cinétique de la réaction peut être assimilée à une cinétique d'ordre zéro, comme il apparaît sur les figures 5 et 6. La figure 9 montre que si la courbe en présence de chlorure de sodium 0,0625 M culmine en un pic étroit à pH 5,3, elle s'

## TABLEAU VIII

Cinétique des réactions en absence (1ère colonne) et en présence (2ème colonne) de chlorure de sodium 0,0625 M.

Milieu réactionnel : tampon 0,05 M (acétate = 1, phosphate = 2, véronal = 3) lysozyme 100 µg/ml, substrat 1,18 mg/ml.

| pH | Tampon | Temps en minutes et secondes | D.o. ×100 | Fonctions réductrices en µMoles de gluc. pour 1 mg de substrat | pH | Tampon | Temps en minutes et secondes | D.o. ×100 | Fonctions réductrices en µMoles de gluc. pour 1 mg de substrat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3,5 | 1 | 0m20s. | 1 | 0,0031 | 3,6 | 1 | 0m.20s. | 6 | 0,019 |
| | | 0m40 s. | 3 | 0,0094 | | | 0m.39 s. | 11,5 | 0,036 |
| | | 0m60 s. | 3 | 0,0094 | | | 0m.59 s. | 17 | 0,053 |
| | | 2m | 10 | 0,0315 | | | 1m.18 s. | 19 | 0,0595 |
| | | 3m | 10 | 0,0315 | | | 1m.37 s. | 22 | 0,069 |
| 4,06 | 1 | 0m20s. | 5 | 0,0155 | 3,95 | 1 | 0m.17s. | 8,5 | 0,0265 |
| | | 1m06s. | 9 | 0,028 | | | 0m.36s. | 19,5 | 0,061 |
| | | 1m30s. | 9,5 | 0,030 | | | 1m.15s. | 25,5 | 0,080 |
| | | 2m | 10 | 0,031 | | | 1m.33s. | 25,5 | 0,080 |
| 4,93 | 1 | 0m22s. | 13,5 | 0,0425 | 4,55 | 1 | 0m.17s. | 16 | 0,050 |
| | | 0m47s. | 20,0 | 0,063 | | | 0m.36s. | 20,5 | 0,064 |
| | | 1m11s. | 27 | 0,0845 | | | 0m.55s. | 29,5 | 0,0925 |
| | | 1m38s. | 26 | 0,0815 | | | 1m.16s. | 29,5 | 0,0925 |
| | | 2m | 28 | 0,0875 | | | 1m.36s. | 30 | 0,094 |
| 5,36 | 1 | 0m18s. | 17 | 0,053 | 5,28 | 1 | 0m.18s. | 25,5 | 0,080 |
| | | 0m39s. | 24 | 0,075 | | | 0m.38s. | 37,5 | 0,117 |
| | | 1m | 24 | 0,075 | | | 0m.59s. | 41 | 0,128 |
| | | 1m23s. | 27 | 0,0845 | | | 1m.21s. | 46 | 0,144 |
| | | 2m | 29,5 | 0,0925 | | | | | |
| 5,39 | 2 | 0m21s. | 19,5 | 0,061 | 5,29 | 2 | 0m.17s. | 24 | 0,075 |
| | | 0m43s. | 23,5 | 0,0735 | | | 0m.35s. | 35 | 0,109 |
| | | 1m10s. | 25 | 0,0785 | | | 0m.53s. | 40 | 0,125 |
| | | 1m37s. | 26,5 | 0,083 | | | 1m.17s. | 45 | 0,141 |
| | | 2m | 27 | 0,0845 | | | 1m.39s. | 46 | 0,144 |
| 5,59 | 2 | 0m20s. | 15 | 0,047 | 5,71 | 2 | 0m.21s. | 21,5 | 0,067 |
| | | 0m47s. | 23,5 | 0,0735 | | | | | |
| | | 1m10s. | 25,5 | 0,080 | | | 1m.02s. | 32,5 | 0,010 |
| | | 1m34s. | 27,5 | 0,086 | | | 1m.22s. | 35 | 0,11 |
| | | 2m | 28,5 | 0,089 | | | 1m.43s. | 36 | 0,11 |

Suite du Tableau VIII

| pH | Tampon | Temps en minutes et secondes | D.o. ×100 | Fonctions réductrices en µMoles de gluc. pour 1 mg de substrat | pH | Tampon | Temps en minutes et secondes | D.o. ×100 | Fonctions réductrices en µMoles de gluc. pour 1 mg de substrat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6,02 | 2 | 0m.20s. | 17 | 0,053 | 6,11 | 2 | 0m.20s. | 18,5 | 0,0625 |
| | | 0m.42s. | 25 | 0,078 | | | 0m.42s. | 27 | 0,0845 |
| | | 1m.05s. | 25 | 0,078 | | | 1m.04s. | 33 | 0,105 |
| | | 1m.27s. | 26 | 0,0815 | | | 1m.24s. | 33,5 | 0,105 |
| | | 2m. | 27,5 | 0,086 | | | 1m.46s. | 31,5 | 0,0985 |
| 6,50 | 2 | 0m.18s. | 13 | 0,0405 | 6,55 | 2 | 0m.17s. | 10,5 | 0,033 |
| | | 0m.38s. | 19,5 | 0,061 | | | 0m.38s. | 16,5 | 0,0515 |
| | | | | | | | 0m.57s. | 20,5 | 0,064 |
| | | 1m.26s. | 26 | 0,0815 | | | 1m.17s. | 20,5 | 0,064 |
| | | 2m.05s. | 25,5 | 0,080 | | | 1m.36s. | 24,5 | 0,0765 |
| 6,74 | 2 | 0m.19s. | 11,5 | 0,036 | 6,99 | 2 | 0m.17s. | 8 | 0,025 |
| | | 0m.44s. | 20,5 | 0,064 | | | 0m.39s. | 15,5 | 0,0485 |
| | | 1m.05s. | 22,5 | 0,0705 | | | 0m.60s. | 19 | 0,0595 |
| | | 1m.30s. | 24 | 0,07514 | | | 1m.17s. | 21 | 0,066 |
| | | 2m. | 24,5 | 0,0765 | | | 1m.36s. | 24,5 | 0,077 |
| 7,44 | 2 | 0m.19s. | 5 | 0,0155 | 7,44 | 2 | 0m.18s. | 6 | 0,019 |
| | | 0m.42s. | 9,5 | 0,030 | | | 0m.38s. | 10 | 0,0315 |
| | | 1m.05s. | 12,6 | 0,039 | | | 0m.60s. | 15 | 0,047 |
| | | 1m.22s. | 18,5 | 0,058 | | | 1m.22s. | 16 | 0,050 |
| | | 1m.51s. | 21,5 | 0,0675 | | | 1m.43s. | 20 | 0,063 |
| 8,62 | 3 | 0m.21s. | 2,5 | 0,0078 | 8,18 | 3 | 0m.16s. | 2,5 | 0,0079 |
| | | 0m.43s. | 7 | 0,029 | | | 1m.03s. | 7 | 0,022 |
| | | 1m.24s. | 8,5 | 0,0265 | | | 1m.28s. | 12 | 0,0375 |
| | | 2m. | 11 | 0,0345 | | | 1m.50s. | 11 | 0,0345 |

étale en absence de sel en un plateau s'étendant entre pH 5,3 et 6,2. L'effet activateur du chlorure de sodium ne se manifeste donc que dans la zone des pH inférieurs à 6,2.

Le pH optimum de la réaction (pH 5,3) n'est donc clairement défini qu'en présence d'une concentration en sels convenable. C'est ce pH que Meyer et Hahnel (1946) avaient également trouvé comme étant le plus favorable à l'hydrolyse de leur mucopolysaccharide. Par contre de nombreux auteurs étudiant la lyse des

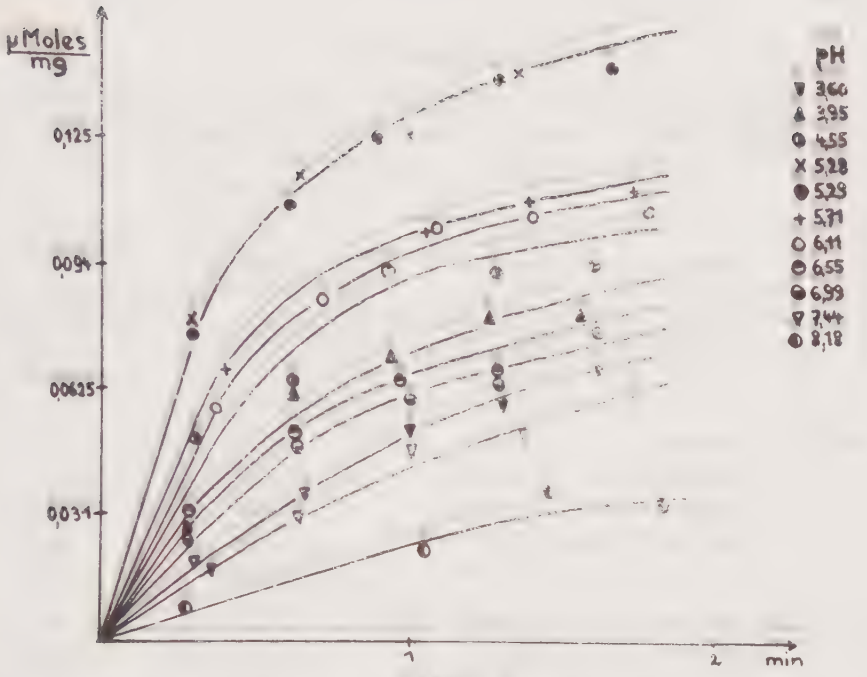



Figure 5

Libération à différents pH de fonctions réductrices, exprimées en µMoles de glucose par mg de substrat sec, par le lysozyme, en présence de NaCl.
(Milieu réactionnel : substrat sec 1,18 mg/ml, lysozyme 100 µg/ml, tampon 0,05 M, NaCl 0,0625 M).

Figure 6

Libération à différents pH de fonctions réductrices, exprimées en µMoles de glucose par mg de substrat sec, par le lysozyme, en absence de NaCl.
(Milieu réactionnel : substrat sec 1,18 mg/ml, lysozyme : 100 µg/ml, tampon 0,05 M, NaCl 0,0625 M

TABLEAU IX

Cinétiques des réactions en absence (1ère colonne) et en présence (2ème colonne) de chlorure de sodium 0,0625 M.)

Milieu réactionnel : tampon 0,05 M (acétate = 1, phosphate = 2) lysozyme 50 µg, substrat : 1,18 mg/ml.

| pH | Tampon | Temps en minutes et secondes | D.O. ×100 | Fonctions réductrices en µMoles de gluc. pour 1 mg de substrat | pH | Tampon | Temps en minutes et secondes | D.O. ×100 | Fonctions réductrices en µMoles de gluc. pour 1 mg de substrat |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4,53 | 1 | 0m.22s. | 7 | 0,0219 | 4,53 | 1 | 0m.17s. | 5,5 | 0,0172 |
| | | 0m.40s. | 8 | 0,0250 | | | 0m.31s. | 16 | 0,05 |
| | | 0m.60s. | 13,5 | 0,0423 | | | 1m.02s. | 14,5 | 0,0454 |
| | | 1m.21s. | 9,5 | 0,0297 | | | 1m.24s. | 26 | 0,0814 |
| | | 1m.44s. | 14 | 0,0438 | | | 1m.46s. | 35 | 0,0783 |
| 5,57 | 2 | 0m.16s. | 6 | 0,0188 | 5,50 | 2 | 0m.17s. | 12 | 0,0376 |
| | | 0m.33s. | 19 | 0,0595 | | | 0m.36s. | 29 | 0,0908 |
| | | 0m.49s. | 20,7 | 0,0648 | | | 0m.55s. | 30 | 0,093 |
| | | 1m.09s. | 29,5 | 0,0924 | | | 1m.18s. | 40 | 0,125 |
| | | 1m.25s. | 30 | 0,0939 | | | 1m.42s. | 40 | 0,125 |
| 6,12 | 2 | 0m.16s. | 5,5 | 0,0172 | 8,05 | 2 | 0m.21s. | 9,5 | 0,0297 |
| | | 0m.35s. | 20 | 0,0626 | | | 0m.41s. | 21 | 0,0657 |
| | | 0m.53s. | 25 | 0,0783 | | | 1m.08s. | 27,5 | 0,0864 |
| | | 1m.10s. | 27,5 | 0,086 | | | 1m.23s. | 27 | 0,0845 |
| | | 1m.29s. | 33,5 | 0,105 | | | 1m.39s. | 30 | 0,094 |
| 6,68 | 2 | 0m.17s. | 9 | 0,0282 | 8,64 | 2 | 0m.15s. | 5 | 0,015 |
| | | 0m.36s. | 19,5 | 0,061 | | | 0m.15s. | 21,5 | 0,066 |
| | | 0m.54s. | 22,5 | 0,0704 | | | 0m.49s. | 19,5 | 0,061 |
| | | 1m.13s. | 27,5 | 0,0861 | | | 1m.09s. | 28,5 | 0,089 |

bactéries entières trouvèrent des pH de 6,05 (Thomson 1940), 6,2 (Boasson 1938), 6,5 (Wilson 1950), 6,6 (Smolelis et Hartsell 1952), et 7,2 (Colobert 1957). Enfin Salton (1956), en utilisant comme substrat une suspension de parois isolées, trouva un pH optimum de 6,5 pour une force ionique de 0,1.

Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer de la façon suivante. Les auteurs ayant travaillé sur des suspensions bactériennes ont mesuré à la fois la lyse des parois bactériennes par le lysozyme (phénomène enzymatique spécifique) et la dispersion du protoplasme (phénomène physique non spécifique)

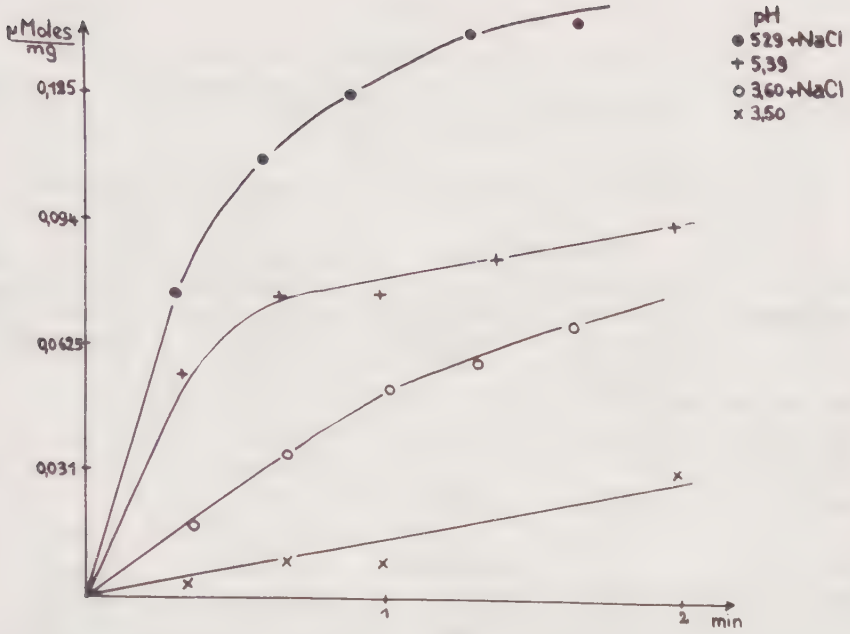



Figure 7

Cinétiques comparées à pH acide et au pH optimum de deux réactions d'hydrolyse du substrat par le lysozyme en présence et en absence de NaCl 0,0625 M.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 1,18 mg/ml, lysozyme : 100 µg/ml, tampon 0,05 M).

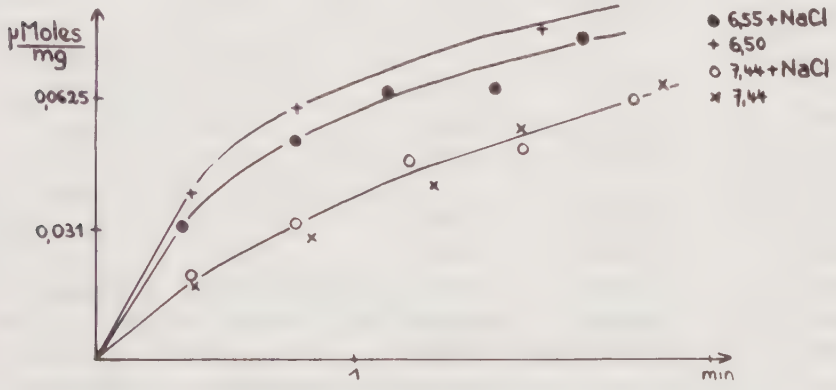



Figure 8

Cinétiques comparées autour de la neutralité de deux réactions d'hydrolyse du substrat par le lysozyme en présence et en absence de NaCl 0,0625 M.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 1,18 mg/ml, lysozyme : 100 µg/ml, tampon : 0,05 M.).

## TABLEAU X

### Vitesse initiale de la réaction en fonction du pH.

Milieu réactionnel : tampon 0,05 M (tampon acétate = 1, tampon phosphate = 2, tampon véronal = 3) lysozyme 100 µg/ml, substrat sec 1,18 mg/ml.

| pH | Tampon | Réaction en absence de NaCl — Vitesse initiale | | Réaction en présence de Nacl 0,0625 M — Vitesse initiale | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | en µMoles de glucose dans la prise d'essai de 0,2 ml | en µMoles de glucose pour 1 mg de substrat | en µMoles de glucose dans la prise d'essai de 0,2 ml | en µMoles de glucose pour 1 mg de substrat |
| 3,6 | 1 | 0,00074 | 0,00315 | 0,0041 | 0,017 |
| 3,95 | 1 | - | - | 0,0075 | 0,031 |
| 4,06 | 1 | 0,0018 | 0,00785 | - | - |
| 4,55 | 1 | - | - | 0,01 | 0,0425 |
| 4,91 | 1 | - | - | 0,0148 | 0,0625 |
| 4,92 | 1 | - | - | 0,0140 | 0,0595 |
| 4,93 | 1 | 0,0077 | 0,033 | - | - |
| 5,12 | 1 | - | - | 0,0148 | 0,0625 |
| 5,28 | 1 | - | - | 0,0177 | 0,075 |
| 5,29 | 2 | - | - | 0,0177 | 0,075 |
| 5,36 | 1 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 5,39 | 2 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 5,59 | 2 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 5,66 | 2 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 5,71 | 2 | - | - | 0,0125 | 0,053 |
| 5,80 | 2 | 0,0105 | 0,044 | 0,0125 | 0,053 |
| 5,83 | 2 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 6,02 | 2 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 6,11 | 2 | - | - | 0,011 | 0,047 |
| 6,18 | 2 | 0,011 | 0,047 | - | - |
| 6,50 | 2 | 0,0096 | 0,041 | - | - |
| 6,55 | 2 | - | - | 0,0073 | 0,030 |
| 6,74 | 2 | 0,0077 | 0,033 | - | - |
| 6,85 | 2 | 0,0077 | 0,033 | - | - |
| 6,99 | 2 | - | - | 0,0055 | 0,0235 |
| 7,44 | 2 | 0,0033 | 0,014 | 0,0033 | 0,014 |
| 8,18 | 2 | 0,0015 | 0,00635 | 0,0015 | 0,00635 |
| 8,62 | 3 | 0,0015 | 0,00635 | 0,0015 | 0,00625 |

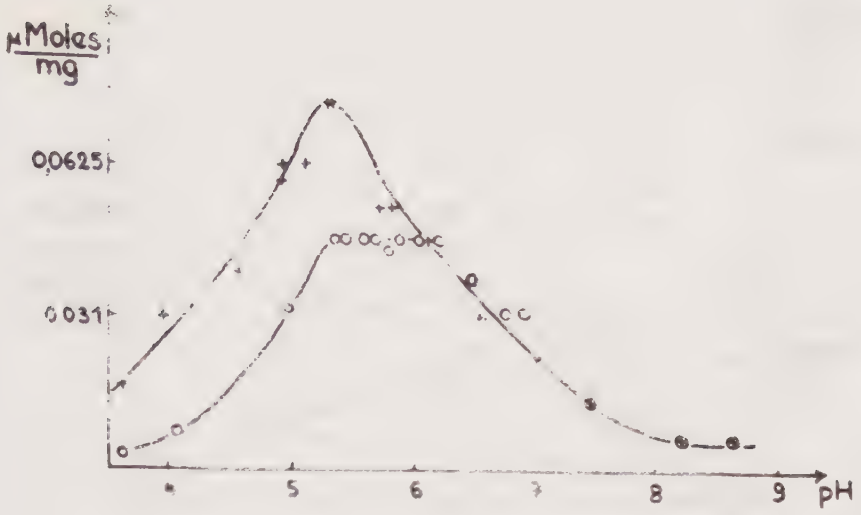



Figure 9

Vitesses initiales d'hydrolyse (exprimées en µMoles de glucose par mg de substrat sec libérées après 17,5 secondes) en fonction du pH en présence (+) et en absence (0) de NaCl 0,0625 M.

phénomènes dépendant tous les deux, mais de manière différente, des conditions expérimentales, en particulier de la concentration en sels (Colobert 1957). Pour sa part Salton (1956), opérant sur les parois isolées, a mesuré l'apparition de fonctions réductrices dans le milieu, mais sans déterminer avec précision les vitesses initiales, de plus il a utilisé un milieu de force ionique plus faible que le nôtre.

Nous avons fait varier la concentration en chlorure de sodium d'une part aux pH extrêmes et d'autre part au voisinage du pH optimum. Les figures 10, 11 et 12 illustrent les résultats obtenus.

A pH 3,5, plus la concentration en chlorure de sodium augmente, plus la vitesse initiale de la réaction croît et ceci jusqu'à la concentration en sel de 0,166 M (Fig. 10). A pH 5,8 le résultat obtenu est différent (Fig. 11). L'effet activateur se manifeste jusqu'à la concentration 0,0625 M, concentration optimum. Au delà le chlorure de sodium inhibe l'hydrolyse. Cet effet, déjà net avec une solution 0,166 M en chlorure de sodium, augmente encore pour une solution 0,5 M.

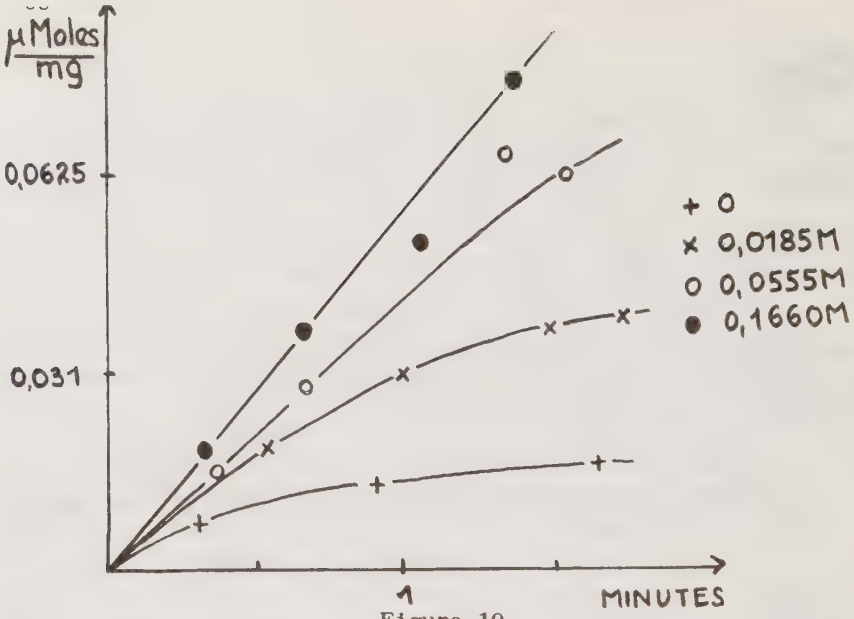



Figure 10

Influence de la concentration en NaCl sur la cinétique de l'hydrolyse du substrat par le lysozyme à pH 3,5.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 1,18 mg/ml, lysozyme : 100 µg/ml, tampon acétate N 0,05 M).

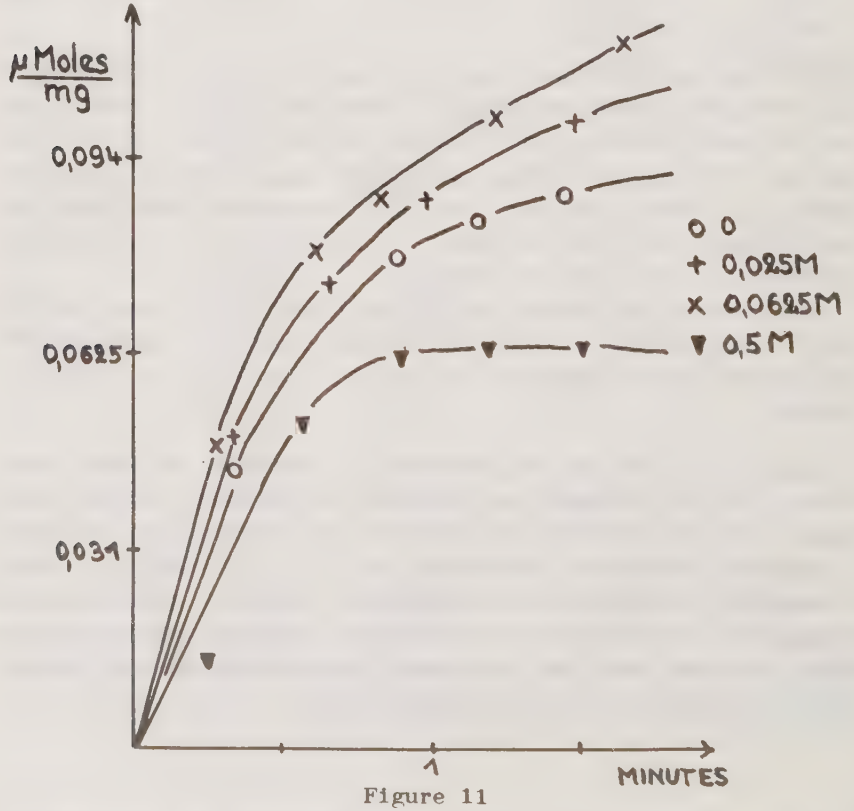



Figure 11

Influence de la concentration en NaCl sur la cinétique d'hydrolyse du substrat par le lysozyme à pH 5,8.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 1,18 mg/ml, lysozyme 100 µg/ml, tampon phosphate 0,05 M).

**Figure 12**

Influence de la concentration en NaCl sur la cinétique de l'hydrolyse du substrat par le lysozyme à pH 8,2.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 1,18 mg/ml, lysozyme : 100 µg/ml, tampon véronal : 0,05 M)

Enfin au pH 8,2 l'effet du chlorure de sodium est bien moins marqué (Fig. 12). La concentration 0,0625 M n'active pratiquement pas la réaction; mais des concentrations supérieures (0,166 M et 0,5 M) l'activent faiblement. Ainsi les concentrations en chlorure de sodium qui, au pH optimum, inhibent la réaction, l'activent aux pH extrêmes et surtout aux pH acides.

2) *Influence de la nature des ions.*

L'effet activateur du chlorure de sodium n'est nullement ment spécifique. Aux mêmes concentrations le chlorure de potassium et le nitrate de sodium ont un effet identique, ainsi que le montre la figure 13. Les expériences ont été réalisées à pH 3,7 avec la concentration en sel 0,125 M.

3) *Influence de la concentration en enzyme.*

Ayant établi le pH et la concentration optimum en sel pour l'hydrolyse enzymatique du mucopolysaccharide, nous avons étudié l'influence de la concentration en lysozyme sur la vitesse initiale. La figure 14 donne les cinétiques d'une série de réactions, la concentration en enzyme variant de 32 µg à 620 µg par ml, la concentration en substrat étant maintenue constante

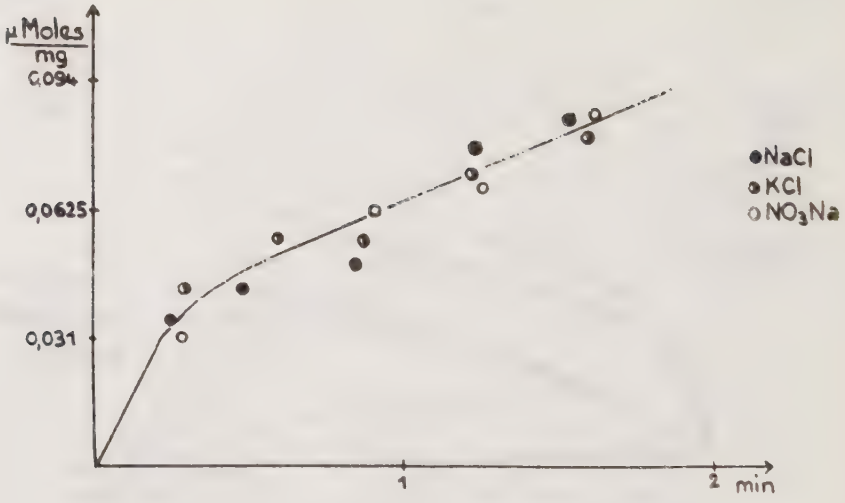



**Figure 13**

Influence de différents sels sur l'hydrolyse du substrat par le lysozyme.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 1,18 mg/ml, lysozyme : 100 µg/ml tampon acétate 0,05 M, pH 3,7, concentration des sels 0,125 M).

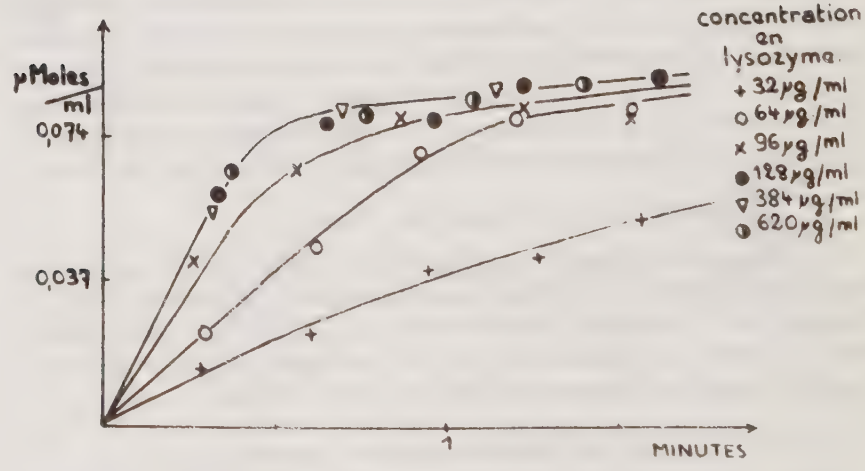



**Figure 14**

Influence de la concentration en lysozyme sur la cinétique d'hydrolyse du substrat.
(Milieu réactionnel : substrat sec : 785 µg/ml, pH 5,3, tampon phosphate 0,05 M, NaCl 0,0625 M, ordonnée : µMoles de glucose par ml de milieu réactionnel).

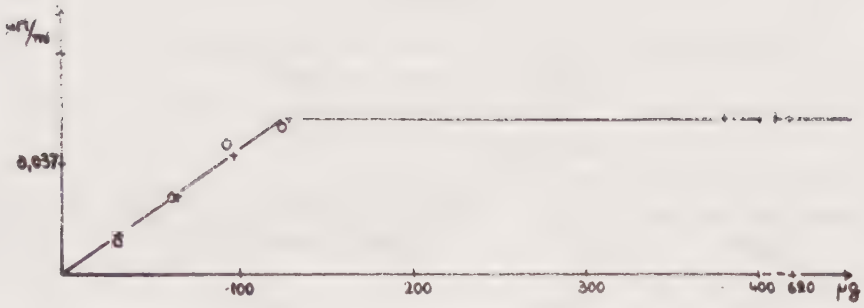



Figure 15

Vitesses initiales de la réaction d'hydrolyse, mesurées en µMoles d'équivalents glucose libérées au bout de 17,5 secondes dans 1 ml de milieu réactionnel, en fonction de la concentration en lysozyme. (Milieu réactionnel : substrat : 765µg/ml, pH 5,3, tampon phosphate 0,05 M, NaCl 0,0625 M).

à 765 µg de substrat sec par ml, le pH étant de 5,3 et la concentration en chlorure de sodium de 0,0625 M.

La figure 15 donne les résultats de deux series d'expériences mesurant la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en lysozyme. Elle met en évidence la proportionalité entre les fonctions réductrices libérees au bout de 17,5 secondes et la concentration en enzyme dans un domaine allant jusqu'à 100 µg/ml. La détermination de la vitesse d'hydrolyse pendant cette période constitue donc une mesure de l'activité enzymatique. Par convention, on dira qu'une solution de lysozyme manifeste une unité d'activité enzymatique quand elle libère en 1 minute à 37°C, dans les conditions expérimentales precisées, des substances réductrices équivalentes à 0,0135 µMoles de glucose (le pouvoir réducteur étant dosé au bout de 17,5 secondes par la méthode au ferrocyanure de Park et Johnson dans une prise d'essai de 0,2 ml du milieu réactionnel suivant : substrat sec 765 µg par ml, tampon phosphate 0,05 M, pH 5,3, NaCl 0,0625 M) 10 µg de lysozyme de blanc d'oeuf de poule ARMOUR manifestent une unité d'activité enzymatique ainsi définie.

4° *Influence de la concentration en substrat.*

Pour établir les vitesses initiales d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat, nous avons opéré avec une concentration en enzyme de 100 µg/ml à pH 5,3 et en présence de chlorure de sodium 0,0625 M. Les resultats pour des valeurs de substrat variant entre 400 µg/ml et 2000 µg/ml sont consignees

TABLEAU XI

Vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration de substrat

Milieu réactionnel : tampon $PO_4Na_2H/PO_4KH_2$ ; 0,05 M, lysozyme 100 µg/ml; NaCl 0,0635 M.

| Substrat sec en mg/ml | D.O. | µMoles de glucose de libérés au bout de 17,5 secondes dans la prise d'essai de 0,2 ml |
|---|---|---|
| 0,4 | 0,165 | 0,0107 |
| 0,8 | 0,22 | 0,014 |
| 1,2 | 0,23 | 0,015 |
| 1,6 | 0,25 | 0,016 |
| 2,0 | 0,26 | 0,017 |

TABLEAU XII

| S = substrat en µMoles par ml | V = vitesse en µMoles de glucose par minute par ml | $\frac{I}{V}$ | $\frac{I}{S}$ |
|---|---|---|---|
| 0,56 | 0,205 | 4,88 | 1,79 |
| 1,12 | 0,270 | 3,7 | 0,89 |
| 1,68 | 0,285 | 3,5 | 0,59 |
| 2,24 | 0,308 | 3,24 | 0,44 |
| 2,80 | 0,324 | 3,08 | 0,36 |

dans le tableau XI. Dans le tableau XII nous avons transformé les µg de substrat en micromoles par millilitre de milieu réactionnel en supposant qu'une mole de substrat renfermait 1 mole de glucose. Nous y avons également fait figurer les vitesses de réaction en micromoles de glucose libérées par minute par millilitre de milieu réactionnel et les inverses des vitesses de réaction et des concentrations en substrat.

La figure 16 tirée du tableau XII montre que quand la concentration du substrat augmente la vitesse initiale de la réaction commence par augmenter puis atteint un maximum. La courbe a l'allure d'une hyperbole équilatère qui tend assymptotiquement vers une valeur maximum (vitesse maximum). En exprimant l'inverse des vitesses initiales en fonction de l'inverse des

Figure 16

Vitesses initiales de la réaction en µMoles d'équivalents glucose libérés par minute et par ml de milieu réactionnel, en fonction de la concentration de substrat en µMoles par ml.
(Milieu réactionnel : lysozyme 100 µg/ml, pH 5,3, tampon phosphate 0,05 M, NaCl 0,0625 M).

concentrations de substrat on obtient une droite qui coupe l'axe des abscisses pour la valeur de $\frac{-1}{Km}$ (Lineweaver et Burk 1936) Km étant la constante de Michaëlis. Le calcul donne Km = 4,42, $10^{-7}$ M. (Fig. 17)

**III. Formation d'un précipité par excès d'enzyme.**

Les résultats expérimentaux déjà cités nous ayant montré la grande influence sur la vitesse de réaction des ions minéraux, nous avons essayé d'opérer en milieu absolument dépourvu de sels pour préciser leur mécanisme d'action. Or lorsqu'à une solution de 1 mg de substrat lyophilisé dans 1 ml d'eau pure (le pH était alors de 4,3), nous avons ajouté 400 µg de lysozyme contenus dans 0,16 ml d'eau bidistillée, un trouble, puis un précipité se constitue dans le milieu. On voit sur la figure 18 que l'addition successive de petits volumes de la solution de lysozyme à 2,5 mg/ml, provoque l'apparition presque instantanée d'un précipité, l'opacité de la solution évaluée au photomètre s'intensifie encore avec le temps tant que la quantité

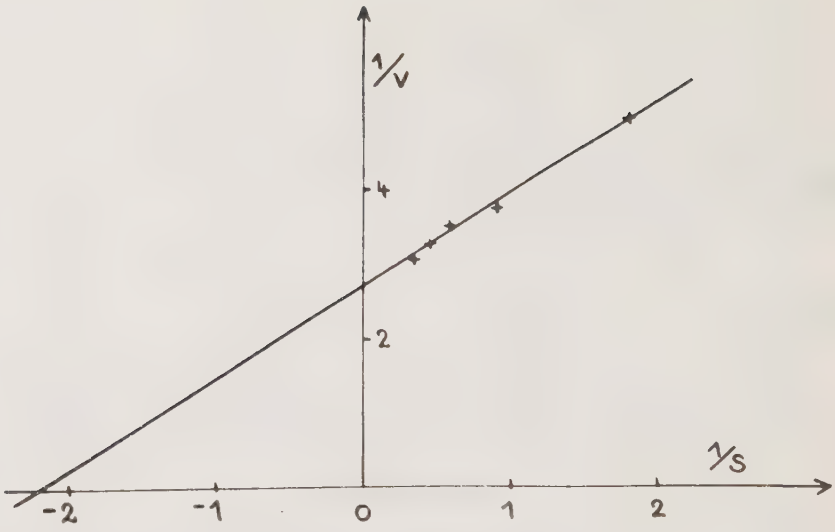



Figure 17

Inverse des vitesses de la réaction en fonction des inverses de la concentration en substrat d'après le tableau XII.

de lysozyme ajoutée demeure inférieure à 600 $\mu$g de lysozyme. A ce moment là l'opacité de la suspension, après avoir augmentée, diminue au contraire avec le temps. Enfin au bout de 46 minutes, après avoir ajouté 650 $\mu$g de lysozyme en tout, une nouvelle addition d'enzyme ne provoque plus d'apparition de précipité et la suspension laissée à la température ordinaire s'éclaircit même avec le temps. Cependant, même après 48 heures, un trouble important subsiste dans la solution.

Quand ces 650 $\mu$g d'enzyme sont ajoutés d'un seul coup à 1 ml de la solution de substrat, celle-ci s'opacifie immédiatement par apparition d'un important précipité et pendant 7 minutes cette turbidité augmente pour diminuer ensuite régulièrement (Fig. 18). En ajoutant à la solution de substrat 1250 $\mu$g de lysozyme, on obtient une turbidité maximale encore supérieure à celle obtenue avec 650 $\mu$g. C'est là cependant un maximum qu'il n'est pas possiblesde dépasser (opacité exprimée D.o. : 0,78 à 620 m$\mu$ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur). D'une manière concomittante, nous avons observé une augmentation du pouvoir réducteur du milieu réactionnel qui témoigne que, malgré le fort excès de lysozyme, l'activité enzymatique n'était pas inhibée (Fig. 19).

Il est remarquable que le précipité ne se forme pas ou beaucoup plus difficilement en présence de sels. De même l'addition de sels à une suspension trouble provoque une redissolution partielle ou totale du précipité, suivant que l'on ajoute plus ou moins de chlorure de sodium. Ainsi l'addition de 0,05 ml d'une solution de chlorure de sodium 0,3 M provoque une régression considérable de celle-ci (Fig. 20). Quand la stabilisation est obtenue, l'addition d'une même quantité de chlorure de

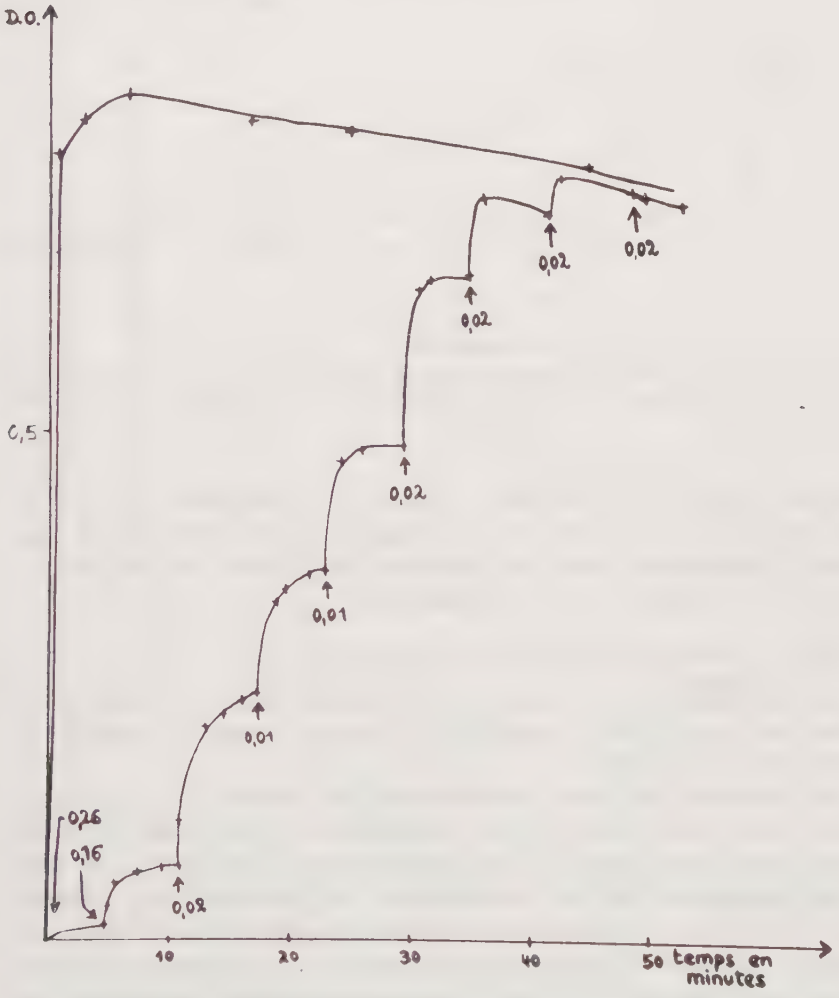



Figure 18

Evolution de l'opacité exprimée en densité optique du mélange substrat-lysozyme en fonction du temps et en fonction du volume d'une solution de lysozyme ajoutée à 1 ml de la solution de substrat. (Concentration de la solution de substrat : 0,765 mg/ml d'eau distillée. Concentration de la solution de lysozyme : 2,5 mg/ml d'eau distillée).

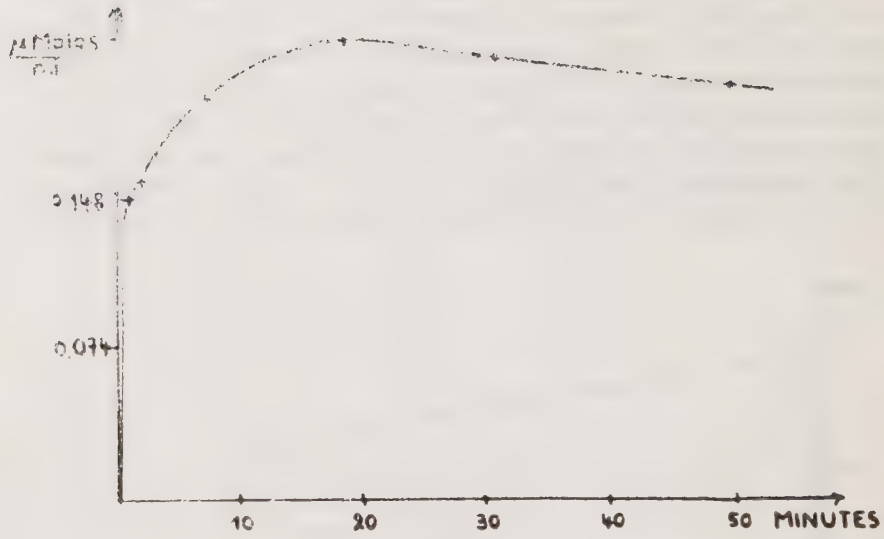



Figure 19

Apparition des fonctions réductrices en µMoles de glucose par ml dans une solution contenant 0,51 mg de substrat sec et 0,834 mg de lysozyme par ml.

sodium provoque la dissolution totale et instantanée du précipité restant. D'une manière analogue, il est possible de dissoudre complètement dans une solution de chlorure de sodium le précipité recueilli par centrifugation.

1) *Le précipité contient du lysozyme.*

Le précipité ainsi obtenu par excès d'enzyme à pH 4,3 et à force ionique nulle, contient du lysozyme comme le montre l'expérience suivante.

On recueille par centrifugation dès sa formation le précipité qui se forme quand à 18°C on ajoute 0,5 ml d'une solution dans l'eau de 1275 µg de lysozyme à 1 ml d'une solution dans l'eau contenant 1000 µg de substrat. Le précipité est dissous dans 4 ml d'une solution de chlorure de sodium 0,5 M. Parallèlement, on amène le surnageant recueilli à un volume de 4 ml et à la concentration 0,5 M en chlorure de sodium. La quantité de protéines contenue dans ces deux solutions est appréciée par la mesure de l'absorption dans l'ultra-violet à la longueur d'onde de 278 mµ comparativement à celle d'une solution témoin de

substrat et d'une solution témoin de lysozyme on trouve ainsi que le surnageant ne contient que 58 % du lysozyme introduit. Inversement la fraction de l'enzyme manquant se retrouve intégralement dans la solution du précipité.

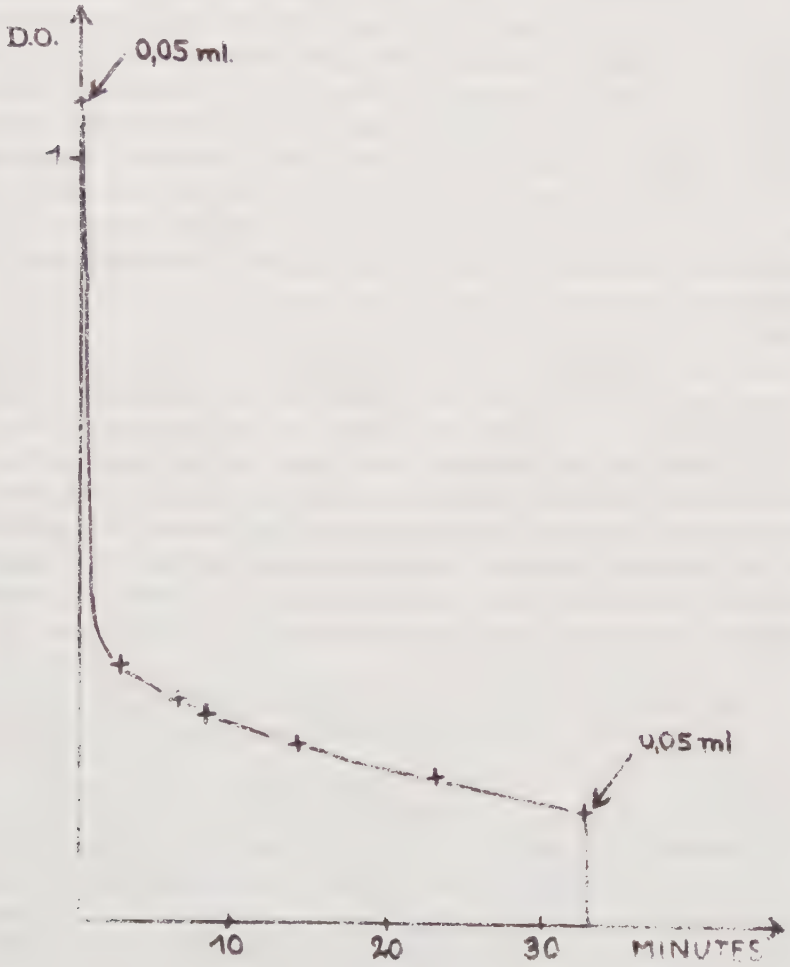



Figure 20

Diminution de l'opacité exprimée en densité optique d'une suspension trouble substrat-lysozyme dans l'eau distillée quand on lui ajoute du NaCl.

(La suspension trouble est obtenue en ajoutant 0,5 ml d'une solution de lysozyme à 2,5 mg par ml à 2 ml d'une solution de substrat sec à 3,765 mg/ml. La solution de NaCl était 0,3 M).

2) *Le précipité contient un produit de dégradation du substrat.*

On a cherché d'autre part à déterminer les éléments provenant du substrat, entrant dans la composition du précipité. La filtration sur Sephadex* a permis de les isoler. L'opération est menée de la manière suivante.

5 g de Sephadex G 75 dans l'eau sont versés dans une colonne de 24 mm de diamètre. Après évacuation de l'eau en excès, on introduit, dissous dans 1 ml d'une solution de chlorure de sodium M, le précipité obtenu à 4°C par l'addition de 1 ml d'une solution aqueuse de lysozyme (2,5 mg) à 2 ml de solution aqueuse de substrat (2,0 mg). On perfuse la colonne avec de l'eau et on recueille des fractions de 2 ml au collecteur de fractions. On évalue dans celles-ci d'une part le lysozyme par absorption dans l'U.V. à 278 mμ, d'autre part les glucides totaux par la méthode de Dische (1955) à l'indole acide sulfurique, plus sensible que la méthode à l'anthrone, et enfin le chlorure de sodium.

Par ce procédé, on sépare d'une part le lysozyme qui est retrouvé dans l'éluat après que 23 ml d'eau ont perfusé la colonne, d'autre part le mélange chlorure de sodium et produits contenant des glucides passant entre 46 et 80 ml. Par contre, en faisant passer sur la colonne une solution de substrat dans du chlorure de sodium M, le mucopolysaccharide est élué après 23 ml de perfusion et le sel toujours après 46 ml. Ces premiers résultats indiquent donc que le précipité contient un produit différent du substrat et de poids moléculaire inférieur.

* Le Sephadex est constitué par des petits grains d'une substance hydrophile obtenue par polymérisation du dextrane. Il est donc constitué d'un réseau tridimensionnel de chaînes polysaccharidiques plus ou moins liées. Placé en présence d'eau, le Sephadex donne des gels insolubles dans l'eau. Ce sont les travaux de Porath et Flodin (1959), Gelotte (1960) et Porath (1960) qui ont en premier mis en évidence la propriété la plus intéressante du Sephadex qui est de permettre à des corps de faible poids moléculaire de diffuser à travers les grains du gel, alors que ceux de haut poids moléculaire ne peuvent y pénétrer. En faisant passer une solution contenant deux corps de poids moléculaire très différent sur une colonne de chromatographie chargée en gel de Sephadex, on peut obtenir, en perfusant avec de l'eau, la séparation de ces deux corps, celui dont le poids moléculaire est le plus fort étant élué le premier. Il existe actuellement trois différentes sortes de Sephadex. Nous en avons utilisé deux. Le Sephadex G 25 et le Sephadex G 25 et le Sephadex G 75 qui excluent de leurs grains des corps d'un poids moléculaire de 3500-4500 pour l'un et de 40000-50000 pour l'autre.

Après filtration sur colonne de Sephadex 75 du précipité redissous dans le chlorure de sodium, on a donc un mélange de sel et de produits contenant des sucres, débarassés du lysozyme. La désalification de ce mélange est obtenue à l'aide d'une nouvelle filtration sur une colonne (diamètre 23 mm, hauteur 560 mm) constituée de Sephadex G 25 cette fois perfusée avec de l'eau. La sortie du chlorure de sodium est en effet très retardée par rapport à celle des éléments contenant des glucides puisqu'il sort après 170 ml alors que les mucopolysaccharides sont déjà retrouvés après 84 ml de perfusion. Les fractions contenant des sucres sont réunies et lyophilisées, puis redissoutes dans un petit volume d'eau. On y a dosé, comparativement à une solution du substrat initial les glucides totaux ($G_T$) par la méthode indole acide sulfurique (Dische 1955) et les glucides aminés ($G_A$) par la méthode de Rondle et Morgan (1955) après une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 3,7 N de 15 heures à 100°C. Le rapport $\frac{G_T}{G_A}$ des glucides totaux exprimés en glucose et des glucides aminés exprimés en glucosamine est de 1,222 pour le substrat intact, et de 3,526 pour les éléments entrant dans la constitution du précipité.

On en conclut que le précipité contient des éléments dérivés du substrat, mais différent du substrat lui-même, notamment par leur faible teneur en glucides aminés, et leur faible poids moléculaire. L'addition d'une quantité suffisante de lysozyme à la solution aqueuse de ces éléments de dégradation du substrat provoque bien la formation d'un précipité. Ce précipité est soluble en présence de sels, mais même dans les conditions d'activité optimale, le lysozyme ne provoque pas la libération de produits réducteurs. Il s'agit donc de produits terminaux de la dégradation enzymatique.

On a cherché, par l'étude comparative de l'évolution du pouvoir réducteur dans le précipité et dans le surnageant, à vérifier si le précipité ne contenait pas, en dehors du complexe formé par le lysozyme et des produits de dégradation terminaux du substrat, soit un complexe entre le lysozyme et le substrat seulement partiellement dégradé, soit le complexe entre le lysozyme et le substrat initial non dégradé. Les résultats de cette étude sont demeurés malheureusement incertains et ne permettent pas de confirmer l'une de ces hypothèses ou de l'éliminer définitivement.

En revanche, il apparaît bien que l'hydrolyse par le lysozyme du substrat purifié porte sur plus d un endroit du substrat. En effet, si, opérant à 4°C, on sépare le précipité par une centrifugation immédiate et de courte durée on constate que le pouvoir réducteur continue à augmenter dans le surnageant séparé du précipité, alors qu'il ne varie pas dans ce dernier redissous dans une solution de chlorure de sodium. Mais l addition de chlorure de sodium au surnageant ne provoque aucune modification de la vitesse d'hydrolyse Il paraît donc nécessaire d admettre que le substrat est alors différent du substrat initial, car dans ces conditions de pH (4,3) le chlorure de sodium activait fortement la réaction. ainsi que nous l'avons vu dans la partie cinétique de notre travail.

# CHAPITRE X

## DISCUSSION DES RESULTATS

Il ressort de notre travail que le substrat du lysozyme isolé par Schutte et Krisch est une substance hétérogène renfermant un constituant non attaqué par le lysozyme. Nous avons réussi à nous débarasser de ce composé inactif par chromatographie sur colonne DEAE. L'analyse du substrat purifié du lysozyme ainsi obtenu a mis en évidence sa composition quantitative suivante glucose, fucose, glucosamine, acide muramique, alanine, acide glutamique, lysine, glycine et phosphore. Il est intéressant de constater que qualitativement la composition de ce substrat est la même (à l'exception des petites quantités de fucose trouvées) que celle donnée par Perkins et Rogers et par Salton pour la paroi isolée de ***Micrococcus lysodeikticus***. Seuls les rapports molaires des constituants diffèrent.

Nous ne nous sommes pas engagés dans la voie de la détermination de l'enchaînement des constituants entre eux. Nous ne pouvons donc, à ce point de vue, que tenir compte des résultats obtenus par les auteurs qui se sont occupés de ce problème de structure. Ces travaux ont porté uniquement sur les parois isolées. Mais vue l'analogie de composition de celles-ci et de notre substance et le fait que tous deux représentent un substrat du lysozyme, nous pensons que le résultat des études de structure sur la paroi peuvent s'appliquer à notre substance. Dans la partie bibliographique de cette thèse nous avons indiqué l'isolement par divers auteurs de toute une série de composés de dégradation de la paroi, soit purement glucidiques, soit glycopeptidiques. Ces résultats ont conduit Litwak (1960), à la suite des hypothèses de Zilliken (1959), à proposer le schéma suivant pour la structure de la paroi de ***Micrococcus lysodeikticus*** (Fig. C).

Les enchaînements et les séquences de ce schéma pourraient peut être s'appliquer en partie au substrat du lysozyme que nous avons isolé.

L'étude des variations de viscosités provoquées par l'en-

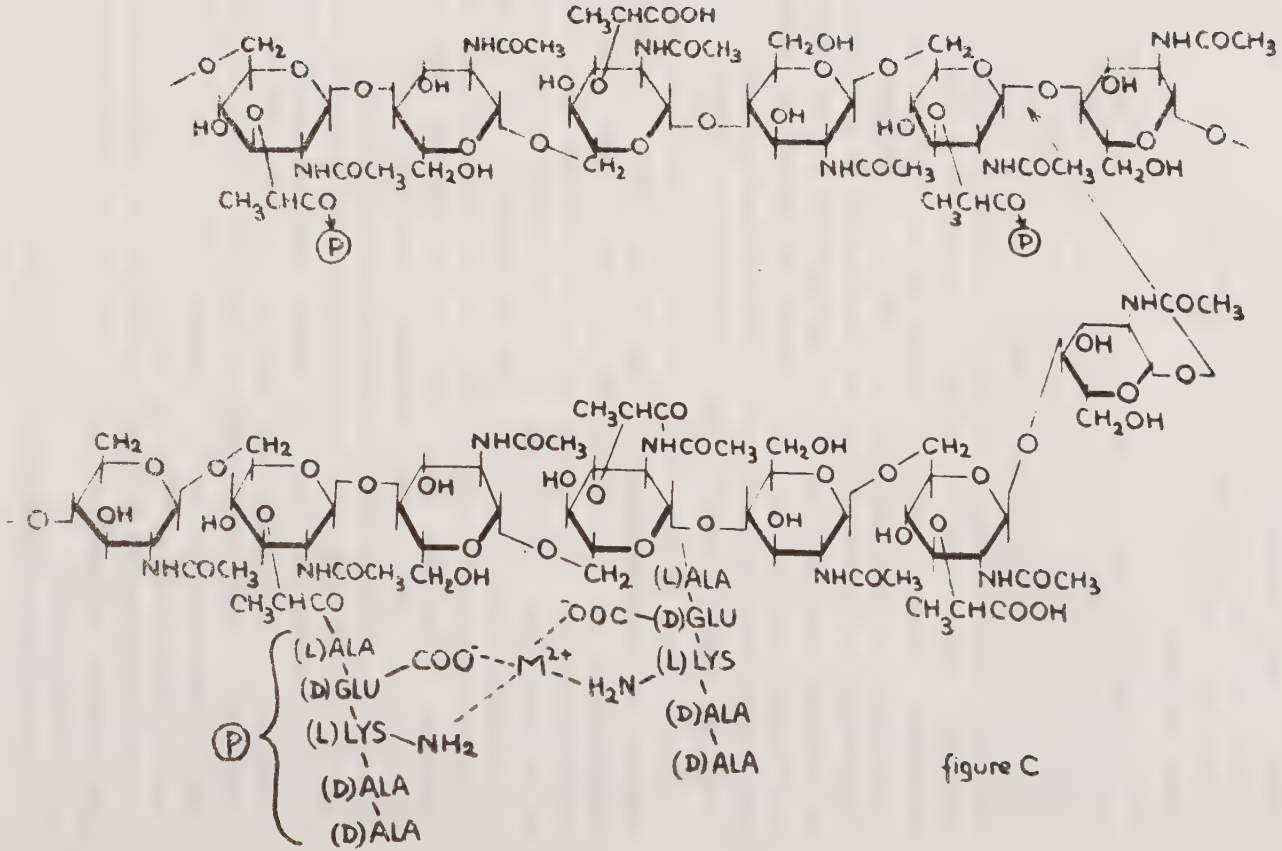

CH3CHCOOH
NHCOCH3
CH2OH
NHCOCH3
CH3CHCO
P
(L)ALA
(D)GLU
(L)LYS
(D)ALA
(D)ALA
COO
M2+
H2N
NH2
COOC
(D)GLU
(L)LYS
(D)ALA
(D)ALA

figure C

zyme aussi bien sur le substrat non purifié de Schutte et Krisch que sur notre substrat purifié ne nous a pas permis de vérifier l'hypothèse avancée par d'autres auteurs d'une activité enzymatique double : dépolymérasique et hydrolasique. En effet, nous avons montré que les diminutions de viscosité observées ne pouvaient être rapportées à l'activité hydrolasique spécifique mais étaient dus, pour une part essentielle, à l'environnement ionique.

Par ailleurs l'activité hydrolasique se manifeste dès l'instant de la mise en contact du lysozyme et de son substrat et non pas seulement après une longue période de latence, comme l'avaient décrit certains auteurs. Il en découle d'une part que le dosage de l'activité enzymatique du lysozyme est illusoire et que d'autre part il n'existe pas une activité dépolymérasique du lysozyme distincte de son activité hydrolasique.

Il résulte des observations faites dans la partie cinétique de notre étude que l'hydrolyse par le lysozyme du substrat obtenu à partir de *Micrococcus lysodeikticus* aboutit à la formation d'un produit de dégradation très appauvri en glucides aminés, qui n'est plus hydrolysable par le lysozyme et qui, dans certaines conditions (force ionique très faible, excès d'enzyme), a la propriété de former avec le lysozyme un complexe insoluble.

Ce phénomène de complexation et de précipitation du lyso - zyme, protéine basique, par une substance acide a d'ailleurs été observé par de nombreux auteurs avec des produits aussi divers que les mucoïdes acides de la glande sous-maxillaire de porc (Simmons 1952), la sérum albumine (Steiner 1953), l'héparine (Kerby et Eadie 1953), certaines glycoprotéines (Caselli et Schumacher 1955) le sulfate de chondroïtine (Badin et Schubert 1955) l'acide hyaluronique, les polysaccharides du pneumocoque, un glutamyl polypeptide du Bacillus anthracis, l'antigène VI et les acides mucléiques (Skarnes et Watson 1955) la pepsine enfin (Caputo 1955) et la conalbumine (Ehrenpreiss et Warner 1956). Nous avons nous-mêmes observé ce phénomène avec des polyphosphates inorganiques. Presque tous ces complexes sont très facilement dissociables par addition de sels neutres. De même la précipitation du substrat dégradé par le lysozyme est un phénomène réversible puisque non seulement l'élévation du pH ou celle de la force ionique le limitent, mais elles permettent la dissolution totale ou partielle du précipité déjà constitué.

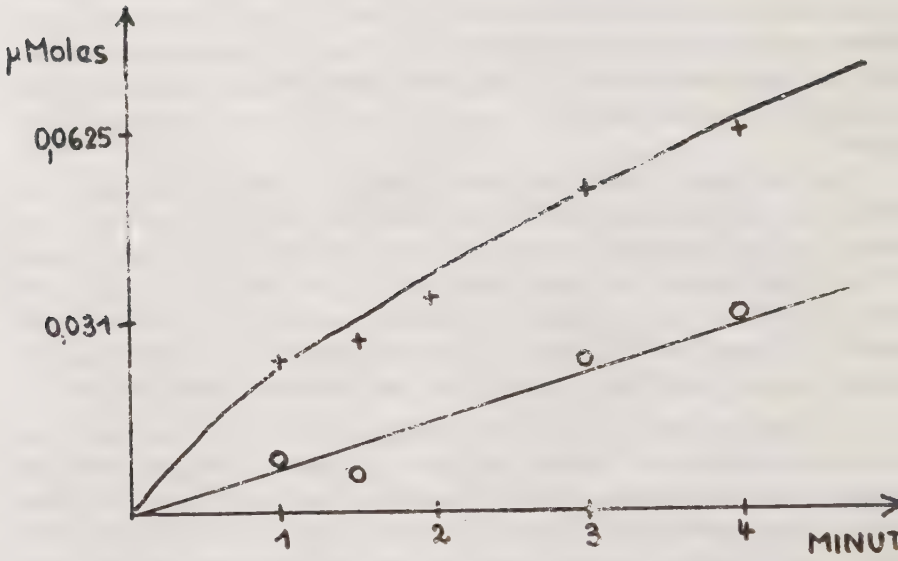



**Figure 21**

Cinétiques de l'hydrolyse du substrat en présence (O) et en absence (+) de substrat dégradé.

A la suite de ces observations nous avons émis l'hypothès que dans les conditions où le précipité n'apparaît pas, condi tions qui furent celles de tous nos essais de cinétique enzy matique, ce produit de dégradation se comporte cependant inhibiteur compétitif.

Nous avons vérifié cette hypothèse en étudiant les cinéti ques d'hydrolyse du substrat purifié à pH 5,3 dans une solu tion tamponnée, mais sans chlorure de sodium, en présence en absence du substrat dégradé obtenu par les techniques d crites au chapitre IX III. La figure 21 donne les résultats de c expériences. On constate donc que le produit de dégradation comporte donc très nettement en inhibiteur. Ce résultat perm d'interprèter les particularités mentionnées précédemment la cinétique enzymatique et d'abord l'allure générale de celle ci.

En tampon phosphate de faible force ionique, au pH optimal, après une courte période où la cinétique paraît d'ordre zéro, la vitesse de la réaction se ralentit rapidement, beaucoup plus rapidement que dans une cinétique d'ordre 1 et tend à s'annuler avant que la totalité du substrat ait été détruit. Si l'on représente par E l'enzyme, S le substrat, $P_1$ les produits de dégradation terminaux que nous avons isolés non sensibles à l'action du lysozyme, $P_2$ d'autres produits de dégradation encore sensibles à l'action de l'enzyme, ES le complexe enzyme-substrat et $EP_1$ le complexe enzyme-produits de dégradation terminaux, on peut schématiser la réaction sous la forme

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow \begin{array}{l} EP_1 + P_2 \\ \uparrow\downarrow \\ NaCl \\ \downarrow\uparrow \\ E + P_1 \end{array}$$

La formation du complexe $EP_1$ est à l'origine du ralentissement de la réaction par blocage de l'enzyme, lorsque la vitesse de dissociation de ce complexe est suffisamment faible pour limiter la vitesse de la réaction globale. Le chlorure de sodium active la réaction enzymatique globale. L'ion $Cl^-$ a paru à certains auteurs (Lobstein et Fogelson 1951), constituer un véritable coenzyme. En réalité le chlorure de sodium, le chlorure de potassium et le nitrate de sodium ont un effet activateur identique. Celui-ci tient donc à l'apport d'ions, indépendamment de la nature de ceux-ci. Comme ces sels sont capables de dissoudre le précipité $EP_1$ ou d'inhiber sa précipitation, l'activation s'explique par le déplacement de l'équilibre de formation du complexe $EP_1$ en faveur de sa dissociation.

Lorsque la force ionique du milieu réactionnel est suffisante, le pH optimum (5,3) est nettement défini (Fig. 9); quand elle est faible on observe un plateau. La différence entre les vitesses initiales observée dans les deux cas pour un même pH mesure l'inhibition due à la formation du complexe $EP_1$ et met en évidence l'influence du pH sur l'équilibre de formation de ce complexe. Ainsi la figure 9 montre que l'inhibition est marquée dans toute la zone de pH inférieure à 5,3, c'est-à-dire au pH optimum d'activité. En revanche, elle décroît rapidement quand on élève le pH et, dans les conditions expérimentales correspondant à la figure 9, elle n'est plus perceptible au-dessus de pH 6,2.

En réalité l'effet activateur du chlorure de sodium se manifeste encore à des pH plus élevés lorsque ce sel est employé à des concentrations supérieures à celle utilisée dans cette expérience (Fig. 12).

Ainsi se trouvent confirmées les conclusions auxquelles avait conduit l'étude cinétique de la lyse des bactéries entières (Colobert 1957 b) et expliquées les raisons du désaccord des auteurs sur le pH optimum du lysozyme. En effet, si la force ionique n'est pas suffisamment élevée, c'est la formation du complexe EP, qui limite la réaction enzymatique globale et non celle du complexe ES; on ne détermine alors qu'un pH optimum apparent.

Les caractères morphologiques de la lyse des bactéries entières se trouvent ainsi expliqués Rappelons que Colobert et Lenoir (1957) ont étudié chez *Sarcina flava* le phénomène de l'inhibition paradoxale de la lyse par excès d'enzyme, déjà observé par Friedberger et Hoder (1932) Thompson (1940) Wilcox et Daniel (1954) Ils ont montré que si la lyse des bactéries appréciée par photométrie paraît inhibée quand on utilise le lysozyme à fortes concentrations, la paroi des bactéries est cependant profondément altérée. Le microscope électronique montre en effet que, bien que la paroi ne se dissolve pas, elle s'est transformée en une masse muqueuse, très gonflée, sans rigidité Le contenu protoplasmique diffuse peu à peu à travers cette paroi altérée, et bientôt celle ci apparaît comme un sac vidé de tout contenu Or, au point de vue néphélométrique, l'opacité de ces suspensions de parois altérées et vidées est plus grande que celle des suspensions microbiennes primitives L'addition à concentration convenable de chlorure de sodium ou d'un autre sel neutre provoque une lyse immédiate et une clarification complète des suspensions De l'analyse du phénomène, Colobert et Lenoir (1957) avaient tiré la conclusion que les parois altérées sont constituées en réalité par un complexe insoluble de lysozyme et de produits de dégradation de la paroi Les résultats enzymologiques exposés dans ce travail établissent le bien fondé de ces interprétations d'observations morphologiques.

De la même manière se trouve confirmée l'interprétation proposée par Colobert et Lenoir (1957) du phénomène de Nakamura (1923). Lorsqu on fait agir le lysozyme sur des bactéries sensibles à pH acide, la lyse ne se produit pas, mais il suffit

d élever le pH même brusquement pour obtenir une lyse instantanée, preuve que les bactéries avaient été préalablement altérées Ce phénomène d'autant plus facile à obtenir que la concentration d'enzyme utilisée est plus élevée, est la conséquence de la formation *in situ* du complexe insoluble $EP_1$.

Enfin l'insolubilité de ce complexe éclaire le mécanisme de la formation des protoplastes On sait qu'au cours de la lyse de *Bacillus megaterium* par le lysozyme apparaissent des formations sphériques qui ne sont autres que la masse protoplasmique de la bactérie dépouillée de la paroi dissoute sous l'action de l'enzyme La plupart des auteurs admettent que cette masse protoplasmique nue ou protoplaste est simplement limitée par la membrane cytoplasmique.

Lorsque la pression osmotique du milieu est suffisamment élevée par dissolution de substances non ioniques, les protoplastes sont stables En revanche, si la pression osmotique est faible, ceux-ci se vident peu à peu de leur contenu et bientôt ne persiste plus que leur enveloppe externe qui apparaît comme une vésicule creuse. On désigne parfois ces formations sous le nom de "fantômes de protoplastes" (ghosts of protoplasts (Weibull 1956)) et on admet généralement qu'il s'agit là des membranes cytoplasmiques dans leur état naturel Cette interprétation a été généralisée aux autres espèces bactériennes directement lysables par le lysozyme, notamment à *M lysodeikticus* et à *Sarsina flava*

Colobert (1957 c, 1958) a eu l'occasion de s'élever contre cette interprétation aussi bien dans le cas des *Sarcina* (1957c) que dans le cas de *Bacillus* Les "fantômes de protoplastes" ne peuvent nullement être considérés comme les membranes cytoplasmiques dans leur état naturel, car ils contiennent du lysozyme qui en fait partie intégrante. En réalité, dans le cas des Sarcines, les auteurs ont établi que ce "fantôme" n'est pas autre chose que le complexe insoluble $EP_1$ (Colobert et Lenoir 1957, Colobert 1957 a). Dans le cas de *Bacillus megaterium*, un doute subsiste encore sur la nature des produits complexés de manière insoluble avec le lysozyme. S'agit-il de produits de dégradation de la paroi comme dans le cas des Sarcines, ou de la membrane cytoplasmique elle-même ?

## RESUME

1) Les procédés de purification des substrats solubles du lysozyme à partir de *Micrococcus lysodeikticus*, proposés jusqu'ici par les auteurs, ne permettant pas d'obtenir des produits purs, nous les avons améliorés par l'usage de la chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose. Ce procédé nous a permis d'isoler un substrat purifié chromatographiquement homogène.

2) L'hydrolyse acide du substrat du lysozyme que nous avons isolé libère du glucose, de la glucosamine, de l'acide muramique, de l'alanine, de l'acide glutamique, de la lysine, de la glycine et de petites quantités de fucose et de phosphore. Nous avons établi les rapports molaires de ces constituants. Le substrat est donc de nature glycopeptidique.

3) L'étude des variations de viscosité provoquées par le lysozyme sur des solutions de substrat n'a pas permis de vérifier l'hypothèse proposée par certains auteurs d'une activité enzymatique double du lysozyme : dépolymérasique et hydrolasique. Les diminutions de viscosité observées ne peuvent être rapportées à l'activité spécifique enzymatique, de plus l'activité hydrolasique se manifeste dès l'instant de la mise en contact du lysozyme et de son substrat et non pas seulement après une longue période de latence comme l'avaient décrite certains auteurs. Pour la même raison le dosage de l'activité enzymatique du lysozyme par viscosimétrie n'est pas valable.

4) La cinétique de l'hydrolyse de ce substrat par le lysozyme a été étudiée par le dosage des fonctions réductrices libérées par l'enzyme. Le pH optimum en présence d'une concentration ionique convenable est de 5,3. La constante de Michaelis est égale à $4,42\ 10^{-7}$ M. Dans les conditions optimales d'activité, les vitesses initiales de la réaction sont proportionnelles à la concentration en enzyme, ce qui nous a permis de définir une unité conventionnelle d'activité du lysozyme.

5) L'hydrolyse par le lysozyme du substrat purifié aboutit à la formation de produits de dégradation appauvris en glucides aminés qui ont la propriété, en absence de sels, de donner des complexes insolubles avec le lysozyme.

6) En présence de sels, la tendance de ce produit de dégradation à former des combinaisons avec le lysozyme se traduit par une inhibition compétitive de l'activité enzymatique. Cette inhibition est d'autant plus marquée que la force ionique est plus faible. Elle est intense dans la zone des pH inférieurs à 5,3, décroît rapidement aux pH supérieurs et ne limite plus la réaction au-dessus de pH 6,2

7) La possibilité de formation de complexes insolubles entre le lysozyme et les produits de dégradation du substrat permet d'interpréter les caractères morphologiques de la lyse des bactéries entières, notamment le phénomène de "l'inhibition paradoxale par excès d'enzyme", le phénomène de Nakamura et dans certaines conditions la formation des protoplastes.

---

# BIBLIOGRAPHIE

---


AGREEN (C.) et VERDIER (C.H.) 1958, *Acta. Chem. Scand.*, **12**, 1927.

ALDERTO (G.), WARD (W.H.) et FEVOLD (H.L.) 1945, *J. Biol. Chem.*, **157**, 43.

AMINOFF (D.), MORGAN (W.T.J.) et WATKINS (W.M.) 1952, *Biochem. J.*, **51**, 379.

ARDENNE (M. von) 1941, *Angew. Chem.*, **54**, 144.

ARMSTRONG (J.J.), BADDILEY (J.), BUCHANAN (J.G.), DAVISON (A.L.), KELEMEN (M.V.) et NENHAUS (F.C.) 1959, *Nature*, **184**, 247.

ASHWELL (G.) 1957, Dans "Methods in Enzymology" COLOWICK (S P.) et KAPLAN (N.O.), Academic Press Inc., New-York, Vol. III, 91.

BABUDIERI (B.) et BIETTI (G.B.) 1945, *Arch. Ophtalmo.* (Chicago), 33, 449.

BACON (E.) et BACON (J.S.D.) 1954, *Biochem. J.*, **58**, 396.

BADDILEY (J.), BUCHANAN (J.G.) et CARSS (B.) 1958, *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 220.

BADIN (J.) et SCHUBERT (M.) 1955, *J.Clin. Invest.*, **34**, 1312.

BARKULIS (S.S.) et JONES (M.F.) 1957, *J.Bacteriol.*, **74**, 207.

BENDICH (A.) 1957, dans "Methods in Enzymology" COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.), Academic Press Inc., New-York, Vol. III, 715.

BERGER (L.R.) et WEISER (R.S.) 1957, *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 517.

BLASS (J.) 1958, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1003.

BLIX (G.) 1948, *Acta Chem. Scand.*, **2**, 467.

BOAS (N.F.) 1953, *J. Biol. Chem.*, **204**, 553.

BOASSON (E.H.) 1938, *J. Immunol.*, **34**, 281.

BOULANGER (P.), BIZERTE (G.) et COURTOT (F.) 1952, *Bull. Soc Chim Biol.*, **34**, 366.

BOURILLON (R.) et MICHON (J.) 1959, *Bull. Soc. Chim Biol.*, **41**, 267.

BRUMFITT (W.), WARDLAW (A.C.) et PARK (J.T.) 1958, *Nature*, **181**, 1783.

CAPUTO (A.) 1955, *Experimentia*, **11**, 44.

CASELLI (P.) et SCHUMACHER (H.) 1955, *Z ges. exp Med.*, **126**, 417.

CIFONELLI (J.A.) et SMITH (F.) 1954, *Anal. Chem.*, **26**, 1132.

COHEN (P.P.) 1940, *J. Biol. Chem.*, **136**, 565.

COLOBERT (L.) 1955, *Thèse de Sciences*, Paris.

COLOBERT (L.) 1957 a, *Ann. Inst. Pasteur*, **92**, 74.

COLOBERT (L.) 1957 b, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 1155.

COLOBERT (L.) 1957 c, *C.R. Soc. Biol.*, **151**, 114.

COLOBERT (L.) et LENOIR (J.) 1957, *Ann. Inst. Pasteur*, **92**, 74.

COLOBERT (L.) et ROCQUET (G.) 1957, *Ann. Inst. Pasteur*, **93**, 665.

COLOBERT (L.) 1958, Résumés VIIe Congr. Intern. Microbiol., Tunevall édit. Upsala, Suède, **25 d**, 419.

CREACH (O.) 1960, *Thèse de Pharmacie*, Lyon.

CRUMPTON (M.J.) 1959, *Biochem. J.*, **72**, 479.

CUMMINS (C.S.) 1956, *Int. Rev. Cytol.*, **5**, 25.

CUMMINS (C.S.) et HARRIS (H.) 1956, *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 583.

CUMMINS (C.S.), GLENDENNING (O.M.) et HARRIS (H.) 1957, *Nature*, **180**, 337.

DISCHE (Z.) 1944, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 217.

DISCHE (Z.) 1949, *J. Biol. Chem.*, **181**, 379.

DISCHE (Z.) 1955, Dans "Methods of Biochemical Analysis", GLICK (D.) Interscience Publish. Inc., New-York, **12**, 319.

DISCHE (Z.) et SHETTLES (L.B.) 1948, *J. Biol. Chem.*, **175**, 595.

DREYWOOD (R.) 1946, *Ing. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **18**, 499.

DUGGAN (E.L.) 1957, dans "Methods in Enzymology", COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.) Academic Press Inc., New-York, **III**, 499.

DUTTA (S.K.), JONES (A.S.) et STACEY (M.) 1953, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 613.

EHRENPREIS (S.) et WARNER (R.C.) 1956, *Arch. Bioch. Biophys.*, **61**, 38.

EISENBERG (H.) et POUYET (J.) 1954, *J. Polymer Sci.*, **13**, 85.

ELSON (L.A.) et MORGAN (W.T.J.) 1933, *Biochem J.*, **27**, 1824.

EPSTEIN (L.A.) et CHAIN (E.) 1940, *Brit. J Exp. Pathol.*, **21**, 339.

FEULGEN (R.) et IMHAUSER (K.) 1958, *Z. Physiol. Chem.*, **311**, 121.

FLEMING (A.) 1922, *Proc. Roy. Soc.*, **93**, 306.

FLEMING (A.) et ALLISON (W.D.) 1922, *Brit. J. Exp. Pathol.*, **3**, 250.

FOSTER (A.B.), NEWTON HEARN (P.A.) et STACEY (M.) 1956, *J Chem Soc* **30**.

FRIEDBERGER (E.) et HODER (F.) 1932, *Immunitätsforsch* **74**, 429.

FROMAGEOT (C.) 1948, *VIIIe Congr. Chim. Biolog.*, p. 63.

FROMAGEOT (C.) et JOLLES (P.) 1955, *Experientia Suppl* **II**, 181.

GARDELL (S.) 1958, dans "Methods of Biochem. Analysis", GLICK (D.), Interscience Publish. Inc., New-York. **6**, 292.

GELOTTE (B.) 1960, *J. of Chromatography*, **3**, 330.

GHUYSEN (J.M.) 1960, *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 473.

GHUYSEN (J.M.) et SALTON (M.R.J.) 1960, *Biochim. Biophys Acta*, **40**, 462.

GRASSMANN (W.) et TRUPKE (J.) 1952, dans "Flaschenträger Lehnartz", Berlin, Göttingen, Heidelberg, Bd. **1**, S : 623, Tab. : 105.

GRULA (E.A.) et HARTSEL (S.E.) 1954 a), *J. Bact.*, **68**, 171.

GRULA (E.A.) et HARTSEL (S.E.) 1954 b, *J. Bact.*, **68**, 302.

GRULA (E.A.) et HARTSEL (S.E.) 1955, *Bact. Proceed.*, **33**, 102.

GRULA (E.A.) et HARTSEL (S.E.) 1957 b, *Canad. J. Microbiol.* **3**, 23.

HALLAUER (C.) 1929, *Zentr. Bakteriol. Parasitenk.*, Abt. 1, **114**, 519.

HARFENIST (E.J.) 1953, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5528.

HAYASHI (J.A.) et BARKULIS (S.S.) 1959, *J. Bacteriol.*, **77**, 177.

HIRS (C.H.W.), STEIN (W.H.) et MOORE (S.) 1954, *J. Biol. Chem.*, **211**, 941.

IMMERS (J.) et VASSEUR (V.) 1950, *Nature*, **165**, 898.

INGRAM (V.M.) et SALTON (M.R.J.) 1957, *Biochim. Biophys Acta*, **24**, 9.

JOLLES (P.), LEDIEU (M.) et ZUILI (S.) 1959, dans "1° *Symp Sul. Lysozyma di Fleming*", Milan.

JOLLES (J.), BERNIER (I.), JAUREGUI (J.) et JOLLES (P.) 1960. *C.R. Acad. Sci.*, **250**, 413.

KEMBLE (A.R.) et MacPHERSON (H.T.) 1954. *Biochem J* 56. 548.

KENT (L.H.) 1957, *Biochem. J.*, **67**, 50.

KERBY (G.P.) et EADIE (G.S.) 1953, *Proc. Soc. Expt Biol. Med* **83**, 111.

KERN (R.A.) KINGKADE (M.J.) KERN (S.F.) et BEHRENS (O.K.) 1951, *J. Bact.*, **61**, 171.

KING (E.J.) 1932, *Biochem. J.*, **26**, 292.

LELOIR (L.F.) et CARDINI (C.E.) 1953, *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 15.

LINEWEAVER (H.) et BURK (D.) 1934. *J Biol Chem Soc* 56 658.

LITWACK (G.) 1960, dans "Symposium on Lysozyme as related to problems in Microbiology" 1960, Annual meeting Society of American Bacteriologists.

LITWACK (G.) et PRAMER (D.) 1956, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **91**, 290.

LOBSTEIN (O.E.) et FOGELSON (S.J.) 1951, *Am J Digestive Diseases*, **18**, 298.

Mc.CARTY 1952 a, *J. exp. Med.*, **96**, 555.

Mc.CARTY 1952 b, *J. exp. Med.*, **96**, 569.

Mc.ILVAINE (T.C.) 1921, *J. Biol. Chem.*, **49**, 183.

MARCKHAM (R.) 1942, *Biochem. J.*, **36**, 790.

MARSHAK (A.) et VOGEL (H.J.) 1951, *J. Biol. Chem.*, **189**, 597.

MEUNIER (P.) et VINET (A.) 1947. Chromatographie et Mésomérie. Masson édit., Paris, p. 19.

MEYER (K.) et HAHNEL (E.) 1946, *J. Biol. Chem.*, **163**, 723.

MEYER (K.), PALMER (J.W.), THOMSON (R.) et KHORAZO (D.) 1936. *J Biol Chem* 113. 479.

MICHAELIS (L.) 1930, *J. Biol. Chem.*, **87**, 33.

MICKLE (H.) 1948, *J. roy. Microsc. Soc.*, **68**, 10.

MOGGRIDGE (R.C.G.) et NEUBERGER (A.) 1938, *J Chem Soc* 745.

MONTREUIL (J.) et SCHEPPLER (N.) 1959, *Bull Soc Chim Biol* **41**, 13.

MOORE (S.) et STEIN (W.H.) 1948, *J. Biol. Chem.*, **176**, 367.

MORGAN (W.T.J.) et ELSON (L.A.) 1934, *Biochem. J.*, **28**, 988.

NAKAMURA (O.) 1923, *Z. Immunitätsforsch.*, **38**, 428.

NEMES (J.L.) et WHEATCROFT (M.G.) 1952, *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.*, **15**, 653.

OGSTON (A.G.) et STANIER (J.E.) 1950, *Biochem. J.*, **46**, 364.

PALMER (J.W.), SMYTH (E.M.) et MEYER (K.) 1937, *J. Biol. Chem.*, **119**, 491.

PARK (J.T.) 1952, *J. Biol. Chem.*, **194**, 877, 885, 897.

PARK (J.T.) et JOHNSON (M.J.) 1949, *J. Biol. Chem.*, **181**, 149.

PARK (J.T.) et STROMINGER (J.L.) 1957, *Science*, **125**, 99.

PARTRIDGE (S.M.) 1948, *Biochem. J.*, **42**, 238.

PARTRIDGE (S.M.) 1949, *Nature*, **164**, 443.

PERKINS (H.R.) 1959, *Biochem. J.*, **73**, 33P.

PERKINS (H.R.) 1960 a, *Biochem. J.*, **74**, 182.

PERKINS (H.R.) 1960 b, *Biochem. J.*, **74**, 186.

PERKINS (H.R.) et ROGERS (H.J.) 1958, *Biochem. J.*, **69**, 15P.

PERKINS (H.R.) et ROGERS (H.J.) 1959, *Biochem. J.*, **72**, 647.

PORATH (J.) 1960, *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 193.

PORATH (J.) et FLODIN (P.) 1959, *Nature*, **183**, 1657.

PRIMOSIGH (J.), PELZER (H.), MAASS (D.) et WEIDEL (W.) 1961, *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 68.

REDFIELD (R.R.) 1953, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 344.

REIMER (S.M.) et LITWACK (G.) 1958, *Fed. Proc.*, **17**, 294.

REIMER (S.M.) et LITWACK (G.) 1961, *Enzymologia*, **22**, 273.

REISSIG (J.L.), STROMINGER (J.L.) et LELOIR (L.F.) 1955, *J. Biol. Chem.*, **217**, 959.

RIMINGTON (C.) 1940, *Biochem. J.*, **34**, 931.

ROBERTS (E.A.H.) 1937, *Quart. J. Expt. Physiol.*, **27**, 89.

RONDLE (C.J.M.) et MORGAN (W.T.J.) 1955, *Biochem. J.*, **61**, 586.

SALTON (M.R.J.) 1952, *Nature*, **170**, 746.

SALTON (M.R.J.) 1953 a, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 512.

SALTON (M.R.J.) 1953 b, *J. Gen. Microbiol.*, **9**, 512.

SALTON (M.R.J.) 1954, *J. Gen. Microbiol.*, **11**, IX.

SALTON (M.R.J.) et GHUYSEN (J.M.) 1959, *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 552.

SALTON (M.R.J.) et HORNE (R.W.) 1951, *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 177.

SALTON (M.R.J.) et PAVLIK (J.G.) 1960, *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 398.

SCHUTTE (E.) et KRISCH (K.) 1958, *Hoppe Seyler's Ztschr. Physiol. Chem.* 311, 121, 131.

SCOTT (T.A.) et MELVIN (E.H.) 1953, *Anal. Chem.*, 28, 1656.

SMITH (E.L.) et STOCKELL (A.) 1954, *J. Biol. Chem.*, 207, 501.

SIMMONS (N.S.) 1952, *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.*, 5, 513.

SKARNES (R.C.) et WATSON (D.W.) 1955, *J. Bact.* 70, 110.

SMITH (H.), STRANGE (R.E.) et ZWARTOUW (H.T.) 1956, *Nature*, 178, 865.

SMOLELIS (A.N.) et HARTSELL (S.E.) 1949, *J. Bact.*, 58, 731.

SMOLELIS (A.N.) et HARTSELL (S.E.) 1952, *J. Bact.* 63, 665.

SOMOGYI (M.) 1952, *J. Biol. Chem.*, 195, 19.

SÖRENSEN (S.P.L.) 1909, *Biochem. Z.*, 21, 131.

SPIES (J.R.) 1957, dans "Methods in Enzymology" COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.) Academic Press Inc., New York, 3, 467.

STACEY (M.) 1958, dans Ciba Symp. on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, J. et A. Churchill, London, 4-21.

STAEHELIN (H.) 1954, *Schweiz. Zeitschr. allg. Path. Backt.*, 17, 296.

STEINER (R.F.) 1953, *Arch. Bioch. Biophys.*, 47, 56.

STEPKA (W.) dans "Methods in Enzymology", COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.) Academic Press Inc., New-York, 3, 519.

STRANGE (R.E.) 1956, *Biochem. J.*, 64, 23P.

STRANGE (R.E.) 1956, *Nature*, 187, 38.

STRANGE (R.E.) et DARK (F.A.) 1956, *Nature*, 177, 186.

STRANGE (R.E.) et KENT (L.H.) 1959, *Biochem. J.*, 71, 333.

STRANGE (R.E.) et POWELL (J.F.) 1954, *Biochem. J.*, 58, 80.

STROMINGER (J.L.), PARK (J.T.) et THOMSON (R.E.) 1959, *J. Biol. Chem.*, 234, 3263.

STUMPF (P.) 1947, *J. Biol. Chem.*, **169**, 376.

SUDHOF (H.), KELLNER (H ) et SCHULTE (N.) 1955, *Z. Physiol Chem.*, **300**, 68.

TALLAN (H H.) et STEIN (W.H.) 1953, *J. Biol. Chem.*, **200**, 507.

TAUFEL (K.) et REISS (R.) 1951, *Z. Anal. Chem.*, **134**, 252.

THOMPSON (R.) 1940, *Arch. Ophtal.*, **25**, 491.

THOMPSON (A.R.) 1955, *Biochem. J.*, **60**, 507.

VISCHER (E.) et CHARGAFF (E.) 1947, *J. Biol. Chem.*, **168**, 781.

WEIBULL (C.) 1956, *Exptl. Cell Res.*, **10**, 214.

WEIDEL (W.) et PRIMOSIGH (J.) 1957 *Z. Naturforsch* **12** b, 421.

WESTPHAL (O.) LUDERITZ (O.). EICHENBERGER (E.) et NETTER (L.) Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Muco polysaccharide, J. et A. Churchill, London, 67.

WILCOX (F.H.) et DANIEL (L.J.) 1954, *Arch. Biochem. Biophys.*, 52. 305.

WILSON (A.T.) 1950, *J. Pediat.*, **36**, 39.

WORK (E.) 1957, *Nature*, **179**, 3941.

WYATT (G.R.) 1951, *Biochem. J.*, **48**, 589.

ZILLIKEN (F.) 1959, *Fed Proc.*, **18**, 966.

ZUCKERKANDL (F.) et MESSINER KLEBERMASS (A ) 1931, *Biochem Z* **19**, 236.

# TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION ..... 5

*1ère Partie* ..... 9

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 9

Chapitre I. LA LYSE BACTERIENNE DIRECTE DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* ..... 9

Chapitre II ISOLEMENT ET ANALYSE DES PAROIS DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* ..... 13

Chapitre III - PREPARATION ET ANALYSE DES SUBSTRATS SOLUBLES OBTENUS A PARTIR DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* ..... 17

Chapitre IV ACTION DU LYSOZYME SUR LES PAROIS ET LES SUBSTRATS SOLUBLES DU LYSOZYME ISOLES A PARTIR DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS* ..... 23

*2ème Partie* ..... 27

RECHERCHES PERSONNELLES ..... 27

Chapitre V. - TECHNIQUES ANALYTIQUES ..... 27

I. Méthodes d'identification des constituants ..... 27

1) Hydrolyse ..... 27

2) Séparation des acides aminés, osamines et oses .. 27

3) Identification des acides aminés ..... 28

4) Identification des osamines ..... 29

5) Identification des oses ..... 29

a) recherches des pentoses ..... 29

b) recherche des désoxysucres ..... 30

c) recherche du fructose ..... 30

6) Recherche des bases puriques et pyrimidiques .... 30

II. Méthodes de dosage des constituants ..... 31

1) Dosage des acides aminés ..... 31

2) Dosage des oses aminés ..... 32

3) Dosage des oses ..... 34

4) Dosage des fonctions réductrices ..... 34

5) Dosage des méthylpentoses ..... 35

Pages

Chapitre VI EFFET DU LYSOZYME SUR LE SUBSTRAT PREPARE SUIVANT LA TECHNIQUE DE SCHUTTE ET KRISCH .. 36

I. Le lysozyme utilisé ..... 36

II. Préparation du substrat selon la technique de Schutte et Krisch ..... 37

1) Préparation des bactéries ..... 37

2) Préparation du mucopolysaccharide ..... 37

III. Effet du lysozyme sur le mucopolysaccharide préparé suivant Schutte et Krisch ..... 38

1) Activité dépolymérasique du lysozyme ..... 39

2) Activité hydrolasique du lysozyme ..... 44

Chapitre VII ISOLEMENT D UN SUBSTRAT DU LYSOZYME CHROMATOGRAPHIQUEMENT PUR ..... 46

I Précipitations fractionnées avec du chlorure de dodécyldiméthylbenzylammonium (catigène) ..... 46

II Essais de précipitation fractionnée par l alcool en présence d'acétate de zinc ..... 47

III. Essais d adsorption sur charbon (Norit S X II) .. 47

IV. Essais d'adsorption sur colonnes échangeuses d'anions ..... 47

1) Cellulose Ecteola ..... 47

2) Diéthylaminoéthylcellulose ..... 47

V Action du lysozyme sur les deux fractions ob tenues sur colonne de DEAE cellulose ..... 49

Chapitre VIII COMPOSITION CHIMIQUE DU SUBSTRAT DU LYSOZYME PURIFIE PAR CHROMATOGRAPHIE ..... 51

I. Analyse qualitative ..... 51

II. Analyse quantitative ..... 51

Chapitre IX CINETIQUE ENZYMATIQUE ..... 57

I. Conditions expérimentales ..... 58

II. Caractères généraux de la réaction ..... 60

1) Influence du pH et du chlorure de sodium ..... 60

2) Influence de la nature des ions ..... 69

3) Influence de la concentration en enzyme ..... 69

4) Influence de la concentration en substrat ..... 71

pages

III. Formation d'un précipité par excès d'enzyme ..... 73
1) Le précipité contient du lysozyme ..... 76
2) Le précipité contient un produit de dégradation du substrat ..... 78

Chapitre X. - DISCUSSION DES RESULTATS ..... 81

Résumé ..... 88

Bibliographie ..... 91

Table des Matières ..... 98

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté :

Le problème de la détermination de la séquence des nucléotides dans les acides ribonucléiques

---

Vu, Strasbourg, le 12 août 1961

Le Président du Jury

J.P. Ebel

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 25 juillet 1961

Le Doyen de la Faculté
de Pharmacie

P. Duquénois

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 28 août 1961

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université

J F. Angelloz